



Title	創薬早期における薬剤誘発性 QT 延長リスクの in vivo 評価法に関する研究
Author(s)	田保, 充康
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第9487号
Issue Date	2010-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k9487
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/42814
Type	theses (doctoral)
File Information	tabo_thesis.pdf



[Instructions for use](#)

創薬早期における薬剤誘発性 QT 延長
リスクの *in vivo* 評価法に関する研究

田保 充康

目次

I	序論	1
II	実験方法	5
A	麻酔モルモットにおけるMAP測定	5
1	動物	5
2	MAP及び心電図測定法	5
3	群構成	6
4	薬物投与	7
5	実験方法	8
B	麻酔イヌにおける心房ペーシング刺激下での心電図測定	9
1	動物	9
2	ペーシング刺激及び循環器系パラメータ測定法	9
3	群構成	10
4	薬物投与	11
5	実験方法	11
C	覚醒マーモセットにおけるテレメトリーシステムによる心電図測定	12
1	動物	12
2	テレメトリー送信器埋め込み法	13
3	群構成	13
4	薬物投与	14
5	実験方法	14
6	血漿中濃度測定法および蛋白結合率測定法	15
D	薬物	16
E	統計学的解析	17

III	実験結果	18
A	麻酔モルモットにおける薬物の MAP 持続時間に対する作用	18
1	陽性対照薬の作用	19
2	陰性対照薬の作用	23
3	陽性対照薬の MAP _{90(pacing)} 延長作用と臨床における QT 延長作用 あるいは hERG 抑制作用との比較	25
B	麻酔イヌにおける薬物の心房ペーシング刺激下での QT 間隔に 対する作用	27
1	QT 補正式に関する検討	27
2	陽性対照薬の作用	31
3	陰性対照薬の作用	32
4	QT 延長作用に対する反応性と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較	32
C	テレメトリーマーモセットにおける薬物の QT 間隔に対する作用	35
1	QT 補正式に関する検討	35
2	陽性対照薬の作用	38
3	陰性対照薬の作用	41
4	QT 延長作用に対する反応性と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較	43
IV	考察	44
V	総括	50
	謝辞	53
	引用文献	54
	英文抄録	65

略語表

CV	Coefficient of variance
ECG	Electrocardiogram
ED ₅	5% effective dose
hERG	Human <i>ether-a-go-go</i> related gene
HPLC	High performance liquid chromatography
HTS	High throughput screening
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
I _{Kr}	Delayed rectifier potassium currents activated rapidly
I _{Ks}	Delayed rectifier potassium currents activated slowly
I _{to}	Transient outward currents
LC-MS/MS	Liquid chromatography - mass spectrometer / mass spectrometer
MAP	Monophasic action potential
MAP _{90(pacing)}	Monophasic action potential at 90% repolarization levels under atrial pacing
MAP _{90(sinus)}	Monophasic action potential at 90% repolarization levels at sinus rhythm

QTc	Corrected QT interval
QTcB	QT interval corrected by Bazett's formula
QTcF	QT interval corrected by Fridericia's formula
QTci	QT interval corrected by individual rate-correction
QTcM	QT interval corrected by Matsunaga's formula
QTcV	QT interval corrected by Van de Water's formula
QTcX	QT interval corrected by study original formula
TdP	<i>Torsades de Points</i>

I 序論

心電図は心臓内での興奮の発生（脱分極）・消失（再分極）と興奮波の伝導で成り立っており、P波は心房筋の興奮、QRS波は心室筋の興奮、T波は心室筋の興奮の消失に伴う電位変化を表している。医薬品の服用により心電図のQT間隔延長を伴う致死性不整脈(TdP)発生の臨床事例が1990年代から報告され、薬剤誘発性QT延長作用と定義されている(De Ponti *et al.*, 2001)。QT間隔は心室筋の脱分極から再分極までの活動電位持続時間を表しており、脱分極に関与するNaチャンネルやCaチャンネルなどの内向きイオン電流の活性化や再分極に関与するKチャンネルなどの外向きイオン電流の遮断により延長することが知られている(Tamargo, 2000)。薬剤誘発性QT延長作用を示す薬剤の多くがすばやく活性化される遅延整流性K電流を引き起こす I_{Kr} チャンネルの α サブユニットであるhERGチャンネル(Sanguinetti *et al.*, 1995)を遮断することにより活動電位の再分極を抑制し、QT延長作用を示すことが報告された(Haverkamp *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2002; Redfern *et al.*, 2003)。心室筋再分極過程には、上記 I_{Kr} チャンネルに加えて、ゆっくり活性化される遅延整流性K電流を引き起こす I_{Ks} チャンネル(Barhanin *et al.*, 1996)も関与しており、 I_{Ks} チャンネルの心室筋内分布の特性により I_{Kr} (hERG)チャンネル遮断がQT延長を介して致死性不整脈を発生させると考えられている(Antzelevitch *et al.*, 1999)。すなわち、心室筋壁は心内膜側から心内膜細胞、M細胞、心外膜細胞で構成されており、 I_{Kr} チャンネルの発現量はその3層において同程度であるが、 I_{Ks} チャンネルはM細胞において発現量が非常に少なく、M細胞では再分極に寄与するチャンネルがほとんど I_{Kr} チャンネルである。このため、 I_{Kr} チャンネルを抑制するとM細胞の再分極時間の延長の程度が周辺の細胞よりも大きく、心室筋壁の再分極の不均一性が増大する。再分

極の不均一性により不応期が不均一となり、迂回してきた活動電位が興奮の終了した細胞を再度興奮させて、異常興奮波が繰り返し出現するリエントリー性不整脈の発生リスクが高まる。このことが I_{Kr} チャンネル阻害による TdP の発生原因と考えられている。

QT 延長作用が原因で市場撤退した薬剤の致死性不整脈の発生頻度は一万例から十万例に数例ではあるが、発生した場合のリスクが致死的事から医薬品開発において非常に大きな問題となっている。日米欧 3 極の行政および産業の代表者が医薬品開発・使用のための共通ガイドラインを作成・決定する意思決定議会である日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) において、薬剤誘発性 QT 延長リスクを評価するための非臨床ガイドライン (S7B) 及び臨床ガイドライン (E14) が 2005 年に採択され、すべての新規薬剤で QT 延長作用に対する非臨床及び臨床の評価を行うこととなった (ICH S7B, 2005; ICH E14, 2005)。

現在、医薬品の開発には非常に多額の費用が必要である。特に多額の費用がかかる開発後期での開発中止を避けるため、創薬早期段階から薬効面、代謝面、安全性面などを考慮した数多くのスクリーニング実験を実施する必要があり、少量の化合物量での各スクリーニング系の実施・評価が求められている。QT 延長評価では、QT 延長作用を示す薬剤の多くが hERG チャンネルを遮断することにより QT 延長作用を示すことから (Webster *et al.*, 2002; Redfern *et al.*, 2003)、hERG チャンネルを強制発現させた細胞を用いて、パッチクランプ法により hERG チャンネル電流に対する評価が一般的に行われている (Kirsch *et al.*, 2004; Guo & Guthrie, 2005; Takasuna *et al.*, 2009)。しかしながら、心筋活動電位再分極過程には K チャンネル以外に Na チャンネルや Ca チャンネルなどの他のイオンチャンネルも関与しており、hERG チャンネルを遮断しても心筋再分極時間を延長させない薬剤

も多数存在し (Redfern *et al.*, 2003)、hERG 試験だけでは十分なリスク評価とはいえない。そのため、さらに包括的に心筋活動電位の再分極時間に対する評価を行う必要があるが、少量の検体量で評価可能な試験系は少ないのが現状である。

心筋再分極時間の評価に対しては、これまで比較的少量の検体量で評価できる *ex vivo* 試験として、モルモット摘出乳頭筋やイヌ摘出 Purkinje 線維を用いた微小ガラス電極法による心筋活動電位測定系 (Gintant *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2005; Kii *et al.*, 2005) が主に用いられてきた。しかしながら、それらの試験系は臨床において QT 延長作用を示す薬剤が陽性作用を示さない偽陰性の問題が報告され (Guth *et al.*, 2004; Hanson *et al.*, 2006)、原因としては標本の表面灌流法のため薬剤の組織浸透性が低いことが考えられている (Guth *et al.*, 2004)。また、QT 延長作用には自律神経系活性や性ホルモンなどが影響を与える可能性があり (Harada *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2007; Kurokawa *et al.*, 2008; Kakusaka *et al.*, 2009)、さらに代謝物が QT 延長作用を示す可能性もあることから (Vorperian *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999)、*in vivo* での評価がより正確であると考えられる。

そこで、本研究では比較的少量の検体量で評価が可能であり、薬剤の組織浸透性も高いと考えられる *in vivo* 試験法として麻酔モルモットにおける単相性活動電位 (MAP) 測定法、麻酔イヌにおける心房ペーシング刺激下での心電図測定法、及び無麻酔無拘束下マーマセットにおける心電図測定法を開発し、それらの QT 延長評価における有用性について証明するとともに、それらの試験系を用いた創薬早期段階での QT 延長リスク回避戦略について提言する。これにより医薬品開発の非常に早い研究段階から新規薬剤の正確な統合的 QT リスク評価が可能となり、QT 延長評価のパラダイムシフトに繋がると期待される。

本研究の内容はすでに *Journal of Toxicological Sciences* (Tabo *et al.*, 2006)、
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods (Tabo *et al.*, 2007) および
Journal of Toxicological Sciences (Tabo *et al.*, 2008b) に公表されている。

II 実験方法

A 麻酔モルモットにおける MAP 測定

1 動物

雄性 Hartley 系モルモットを日本チャールス・リバー社（筑波、日本）より購入して飼育した後、実験に供した。使用時の週齢及び体重はそれぞれ 9~14 週齢、568.4~907.4g であった。動物は、温度が $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度が $55\pm 10\%$ 、7:00~19:00 に人工照明が施される動物室で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

実験終了後、使用した動物は麻酔下で高濃度カリウム溶液を静脈内投与することにより安楽死処置を行った。

2 MAP 及び心電図測定法

動物を pentobarbital sodium（ネンブタール[®]、アボットラボラトリーズ）40 mg/kg の腹腔内投与により麻酔した後、気管にカテーテルを挿入し、人工呼吸器（MODEL683、HARVARD Apparatus）を用いて呼吸を制御した（室内空気＋酸素、5 ml/kg、90 strokes/min）。頸動脈に血圧測定用カテーテルを、頸静脈に被験物質投与用カテーテルを挿入し、心電図測定用に標準四肢第 II 誘導法に従い電極針を装着した。また、胸部左側から開胸し、左心房にペーシング電極を取り付け、MAP 電極を吸引しながら左心室外壁に当てた。さらに、ペーシング刺激が血圧上昇などの循環器系変化を引き起こして反射性に自律神経系に影響を与える可能性があることから、自律神経系への影響を減らすために、頸部で迷走神経を切断し、さらに被験物質投与開始 15 分以上前に β 受容体遮断薬である

(s)-(-)-propranolol hydrochloride (Sigma Chemical Co.) の 2 $\mu\text{mol/kg}$ を被験物質投与用カテーテルから静脈内投与した (0.5 ml/kg)。手術及び実験は、保温器 (BWT-100、バイオリサーチセンター(株)) を用いて動物の体温が 37°C に維持される条件下で実施した。血圧測定用カテーテルに装着した圧力トランスデューサーからの血圧信号を血圧用アンプ (AP-641G、日本光電工業(株)) を介して測定し、心拍数は血圧の出力を瞬時心拍計ユニット (AT-601G、日本光電工業(株)) に入力して測定した。心電図は標準四肢第 II 誘導法に従って心電図用アンプ (AC-601G、日本光電工業(株)) を介して測定し、MAP はアンプ (DAM50、World Precision Instruments, Inc.) を介して測定した。血圧、心拍数、心電図、MAP はインターフェイス (MP100、BIOPAC Systems) を介してコンピュータに取り込み、電気信号解析ソフト (WinVAS3、(株)フィジオテック) を用いて連続的に記録・解析した。

3 群構成

被験物質として陽性対照薬 8 種 (E-4031、cisapride、astemizole、terfenadine、bepridil、haloperidol、quinidine、*dl*-sotalol) および陰性対照薬 4 種 (diltiazem、verapamil、chlorpheniramine、captopril) を使用した。各被験物質群および溶媒対照群にそれぞれ 5 例を割り当て、計 13 群、65 例とした。各被験物質の投与量を次ページの表に示す。

被験物質	投与量 (μmol/kg)
E-4031	0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1
Cisapride	0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1
Astemizole, Terfenadine, Bepridil, Diltiazem, Verapamil	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3
Haloperidol, Quinidine, <i>dl</i> -Sotalol, Chlorpheniramine	0.1, 0.3, 1, 3, 10
Captopril	0.3, 1, 3, 10, 30

陽性対照薬の最高投与量は、予備検討において明らかな MAP 持続時間の延長を示した用量あるいは溶解限界用量に設定した。陰性対照薬の最高投与量は、予備検討において循環器系に重篤な副作用（過度の血圧低下や心拍数減少）やそれに伴う死亡が認められた用量あるいは溶解限界用量に設定した。また、いずれの被験物質についても最低用量は予備検討において MAP 持続時間に明らかな影響が認められなかった用量に設定し、公比約 3 で中間用量として 3 用量を設けた（計 5 用量）。

4 薬物投与

被験物質は 1%乳酸（Sigma Chemical Co.）に溶解させた。頸静脈内に留置したカテーテルより、被験物質を低用量から順に 0.25 ml/kg の容量を 40 秒間で静脈内投与し、投与間隔は 6 分とした。また、溶媒対照投与群として、溶媒である 1%乳酸を 5 回静脈内投与した。

5 実験方法

解析項目の各パラメータが安定したことを確認した後、実験を開始した。被験物質投与前に洞調律下およびペーシング刺激下（刺激パルス持続時間：2 msec、刺激の強さ：閾値の 1.5 倍、刺激間隔：230～290 msec）で各パラメータを 2 回測定し、その平均値を投与前値とした。各被験物質投与終了後 4 分からペーシング刺激を 1 分間行い、計測ポイントは各被験物質投与終了後 4 分（洞調律下）および 5 分（ペーシング刺激下）とし、5 秒間に得られたデータの平均値をそのポイントにおける測定値とした。なお、ペーシング刺激は電気刺激装置（SEN-3201、日本光電工業株）によりアイソレータ（SS-302J、日本光電工業株）を介して行った。

解析項目は、洞調律下では心拍数および MAP 持続時間、ペーシング刺激下では MAP 持続時間とし、心筋活動電位持続時間は一般的に 90%再分極時間で評価を行うことにより精度の高い解析が可能であるため（Sugiyama *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2005）、MAP 持続時間として $MAP_{90(\text{sinus})}$ （洞調律下で活動電位振幅が最大値の 90%まで再分極する時間）及び $MAP_{90(\text{pacing})}$ （ペーシング刺激下で活動電位振幅が最大値の 90%まで再分極する時間）を採用した。なお、ペーシング刺激により T 波は次の P 波に重なり、T 波終点は特定されないため、QT 間隔は評価項目としなかった。心筋再分極時間は心拍数の影響を受けるため、ペーシング刺激により心拍数を一定にしたときの $MAP_{90(\text{pacing})}$ に対する作用を、薬剤が真に再分極時間に与える作用として評価した。また、 $MAP_{90(\text{pacing})}$ の投与前値からの%変化率を算出し、陽性対照薬については推定 5%延長用量（ED₅）を求めた。

B 麻酔イヌにおける心房ペーシング刺激下での心電図測定

1 動物

雄性イヌ (Beagle/CSK) を CSK リサーチパーク社 (長野、日本) より購入して飼育した後、実験に供した。使用時の月齢及び体重はそれぞれ 10~15 カ月齢、10.0~12.5 kg であった。動物は、温度が $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度が $55\pm 10\%$ 、7:00~19:00 に人工照明が施される動物室で飼育した。餌は毎日約 250 g の犬用固型配合飼料を与え、水は自由に摂取させた。

実験終了後、使用した動物は麻酔下で高濃度カリウム溶液を静脈内投与することにより安楽死処置を行った。

2 ペーシング刺激及び循環器系パラメータ測定法

動物に thiopental sodium (ラボナール[®]、田辺製薬株) 30 mg/kg を静脈内投与し、導入麻酔を行った。気管チューブを挿入した後、人工呼吸器 (model 613、Harvard Apparatus、20 ml/kg、15 strokes/min) により 1.0~1.5% の halothane (フローセン[®]、武田薬品工業株) および酸素ガス (100%) を吸入させた。橈側皮静脈に薬物投与用カテーテルを、大腿静脈に採血用カテーテルを留置し、大腿動脈よりマイクロチップ圧カトランスデューサー (SSD-819、Millar Instruments, Inc.) を挿入し、先端のセンサーは左心室内に、他方のセンサーは大動脈弓に位置するように固定した。右第 4 肋間を開胸後、心膜を切開し、右心房に刺激用電極を装着した。装着後ペーシング刺激が与えられることを確認し、開胸部分を縫合した。また、心電図標準四肢誘導法に従い電極針を装着した。採血用カテーテルには、生理食塩液 (大塚製薬株) にて 100 U/ml に希釈したヘパリン

ナトリウム (1000 U/ml、ノボノルディスク A/S) を充填した。手術及び実験は、保温器 (TP-401、Gaymer Industries Inc.) を用いて動物の体温が 37°C に維持される条件下で実施した。大動脈弓に留置したセンサーからの血圧信号を血圧用アンプ (AP-601G、日本光電工業株) を介して測定し、心拍数は血圧の出力を瞬時心拍計ユニット (AT-601G、日本光電工業株) に入力して測定した。以上のパラメータは、熱ペン式レコーダー (WR3101、グラフテック株) 上に 10 mm/min の速度で連続的に記録した。心電図は標準四肢第 II 誘導法に従って心電図用アンプ (AC-600G、日本光電工業株) を介してコンピュータに取り込み、心電図波形計測ソフト (Softron ECG Processor SP97、株ソフトロン) を用いて、各測定ポイントあたり 8 秒間の心電図波形を加算平均したものについて解析した。ペーシング刺激は電気刺激装置 (SEN-3201、日本光電工業株) を用い、各刺激について 20 秒間ずつ刺激を行った (刺激パルス持続時間: 1 msec、刺激の強さ: 閾値の 2 倍)。

3 群構成

被験物質として陽性対照薬 2 種 (astemizole、*dl*-sotalol) および陰性対照薬 1 種 (propranolol) を使用した。溶媒対照群および *dl*-sotalol 群は各 4 例、astemizole 群と propranolol 群は各 5 例とした。各被験物質の投与量を下表に示す。

被験物質	投与量 (mg/kg)
Astemizole, Propranolol	0, 0.1, 0.3, 1, 3
<i>dl</i> -Sotalol	0, 0.15, 0.5, 1.5, 5

4 薬物投与

被験物質は 1%乳酸（Sigma Chemical Co.）に溶解させた。橈側皮静脈内に留置したカテーテルよりシリンジポンプ（STC-521、テルモ株）を用いて、溶媒、被験物質の最低用量から順に 0.2 ml/kg/min の速度で 10 分間静脈内投与を行った。各投与終了後、20 分間の休薬を行った。また、溶媒対照投与群として、溶媒である 1%乳酸を 5 回静脈内投与した。

5 実験方法

各パラメータが安定したことを確認した後、QT 補正式に関する実験を行い、次いで被験物質投与実験を行った。QT 補正式の検討は 20 例を使用し、被験物質の検討では、20 例中 2 例の心拍数がペーシング頻度である 120 beats/min を超えていたためそれらは実験に使用せず、18 例を各群に振り分けた（群構成参照）。

QT 補正式に関する実験では、右心房に電気刺激を行い、試験開始前の心拍数から 10 beats/min の割合で心拍数を上げ、P 波と T 波が重なり、T 波の頂点の確認が不能となるまで観察し、QT 間隔及び RR 間隔を測定した。測定した QT 間隔および RR 間隔から、以下に示す 4 種の一般補正式、すなわち臨床も含めて一般的に使用される Bazett 及び Fridericia の補正式、イヌにおいて確立された Matsunaga 及び Van de Water の補正式を用いて RR 間隔で補正した値である補正 QT（QTc）間隔を算出した。

$$\text{Bazett} \quad \text{QTcB} = \text{QT} / \text{RR}^{0.5} \quad (\text{Bazett, 1920})$$

$$\text{Fridericia} \quad \text{QTcF} = \text{QT} / \text{RR}^{0.333} \quad (\text{Fridericia, 1920})$$

$$\text{Matsunaga} \quad \text{QTcM} = \text{Log}600 \times \text{QT} / \text{Log RR} \quad (\text{Matsunaga et al., 1997})$$

Van de Water $QTcV=QT-0.087\times(RR-1000)$ (Van de Water *et al.*, 1989)

また、QT 間隔及び RR 間隔をそれぞれ Log 変換した LogQT と LogRR を求め、20 例のすべてのデータをプロットし、その回帰直線の傾きから補正係数である β 値を算出した。その β 値から本試験条件下における試験別補正式を求めた。

試験別補正式 $LogQT=\alpha+\beta\times LogRR$ 、 $QTcX=QT/RR^\beta$ (Spence *et al.*, 1998)

QT 補正式に関する実験の終了後に、各パラメータが安定していることを確認した後、同一個体を用いて以下の被験物質投与実験を行った。各投与開始後 5、10、20 および 30 分に洞調律時のデータを取得した後、刺激間隔 500 msec (刺激頻度：120 beats/min) でペーシング刺激を行い、データを取得した。洞調律下では QT 間隔および RR 間隔を解析し、試験別補正式を用いて QTcX 間隔を算出した。また、ペーシング刺激下では QT 間隔を解析し、 $QT_{(pacing)}$ とした。各被験物質の各用量投与開始後 5、10、20 および 30 分に大腿静脈に留置した採血用カテーテルより約 2 ml を採血した (ヘパリンナトリウム加血液)。溶媒投与群においても被験物質投与群と同様のタイミングで採血を行った。Astemizole 群および *dl*-sotalol 群の血液は直ちに氷冷し、遠心分離後の血漿を採取し、濃度測定時まで約 $-80^{\circ}C$ で保存した。Astemizole 及び *dl*-sotalol の血漿中濃度は HPLC 法により測定した (Yamamoto *et al.*, 2001; Laer *et al.*, 2001)。

C 覚醒マーモセットにおけるテレメトリーシステムによる心電図測定

1 動物

コモンマーモセットを日本クレア(株) (東京、日本) より購入して飼育した後、実験に供した。テレメトリー実験用に雌雄各 2 例、血漿中薬物濃度測定用に雌雄各 2 例、計 8 例の動物を使用した。使用時の年齢及び体重はそれぞれ 2~5

年齢、250～400 g であった。動物は、温度が $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度が $55 \pm 15\%$ 、7:00～19:00 に人工照明が施される動物室で飼育した。餌は固型飼料（CMS-1、日本クレア(株)）を自由摂取とし、補食として粉ミルクやリンゴなどを与えた。水は自由摂取とした。

実験終了後、使用した動物は安楽死処置を行わず、他試験に移管した。

2 テレメトリー送信器埋め込み法

動物を ketamine hydrochloride (50～70 mg/kg, i.m.) と xylazine hydrochloride (5～7 mg/kg, i.m.) で麻酔し、その混合麻酔下でテレメトリー送信器 (TL-11M-C50 PXT、Data Sciences International) の本体を腹腔内に埋め込み、標準四肢第Ⅱ誘導法に従い、送信器の心電図用リード線のマイナス線を第1胸骨上の皮下、プラス線を左側第7肋骨と第8肋骨間上の皮下に縫合した。手術後、抗生物質 streptomycin 25 mg を筋肉内投与した。送信器埋め込み後、1ヶ月以上経過した動物を実験に供した。

3 群構成

被験物質として陽性対照薬 2 種 (astemizole、*dl*-sotalol)、陰性対照薬 2 種 (propranolol、nifedipine) を使用した。各被験物質の投与量を次ページの表に示す。

被験物質	投与量 (mg/kg)
Astemizole	10, 30
<i>dl</i> -Sotalol	5, 15
Propranolol, Nifedipine	30

4 薬物投与

dl-Sotalol と propranolol は蒸留水に溶解させた。Astemizole は 0.5% carboxyl-methylcellulose sodium (CMC、和光純薬工業株)、nifedipine は 0.5% CMC/1.5% dimethyl sulfoxide (DMSO、和光純薬工業株) に懸濁させた。被験物質はディスポーザブルのシリンジ (テルモ株) と 5Fr カテーテル (アトム株) を用いて単回強制経口投与した。投与容量は 2 ml/kg とし、13 時 30 分頃に投与を行った。なお、摂餌による薬物吸収への影響を抑えるため、投与前約 5 時間から投与後約 4 時間まで絶食した。薬剤投与間は 1 週間以上の休薬期間を設定した。

5 実験方法

テレメトリー実験は、受信ボード (RMC-1、Data Sciences International) を 2 個取り付けたケージ (465×465×565 mm) に動物を飼育して行った。テレメトリーデータはデータ取得システム (ART、Data Sciences International) 及びデータ解析システム (HEM 3.5、Notocord Systems SAS) を用いて取得・解析し、QT 補正式に関する検討と各被験物質の反応性に関する検討を実施した。

QT 補正式の検討では、薬物処置を行わず、24 時間の心電図データを取得

し、6分毎に連続10波形のQT、RR間隔について解析し、その平均値を算出した。測定したQT間隔およびRR間隔から、以下に示すBazett (Bazett, 1920) 及びFridericia (Fridericia, 1920) の補正式、並びに個体別補正式 (Miyazaki & Tagawa, 2002) を用いて、RR間隔で補正した値であるQTc間隔を算出した。個体別補正式は、QT間隔及びRR間隔をそれぞれLog変換したLogQTとLogRRを求め、個体毎にすべてのデータをプロットし、その回帰直線の傾きから補正係数である β 値を算出して求めた。なお、マーモセットにおける平均心拍数である約150 beats/min ($RR_{ref}=0.4$ sec) を各補正式に乗して、各補正式の補正レベルを合わせた。

Bazett $QTcB = RR_{ref}^{0.5} \times QT / RR^{0.5}$

Fridericia $QTcF = RR_{ref}^{0.333} \times QT / RR^{0.333}$

個体別補正式 $LogQT = \alpha + \beta \times LogRR$ 、 $QTci = RR_{ref}^{\beta} \times QT / RR^{\beta}$

被験物質の反応性の検討では、被験物質投与後0.5、1、2、4、7、12、24時間の心電図データについて、連続10波形のQT、RR間隔について解析し、その平均値を算出した。また、各個体の個体別補正式により算出されたQTci間隔を求めた。

6 血漿中濃度測定法および蛋白結合率測定法

血漿中薬物濃度の測定には、採血による心電図データへの影響を避けるために、テレメトリー実験とは別個体の動物を使用した。被験物質を投与した後、尾静脈より採血した(ヘパリンナトリウム加血液)。採血ポイントは、astemizole、dl-sotalol 及び propranolol は投与後0.5、1、2、4、7時間、nifedipine は投与後0.25、0.5、1、2、4時間とし、採血量は各ポイントにおいて150 μ lとした。血液を遠

心分離し、上清中の薬物濃度を LC-MS/MS 法により測定した。なお、astemizole については主代謝物である desmethylastemizole が astemizole と同等の hERG 抑制作用および活動電位持続時間延長作用を有することから (Vorperian *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999)、desmethylastemizole ついても測定した。

陽性対照薬である *dl*-sotalol、astemizole および desmethylastemizole については蛋白結合率を平衡透析法により測定した。透析用濾過膜 (HTDialysis) で仕切られた 96 ウェル平衡透析用ブロック (HTDialysis) のサンプル側に血漿サンプル 100 μ l を、濾過側にリン酸バッファー 100 μ l を加えた。37°C で 4 時間インキュベートした後、サンプル側と濾過側の薬物濃度を LC-MS/MS 法で測定し、蛋白結合率を算出した。

D 薬物

被験物質として、astemizole、terfenadine、bepidil hydrochloride、haloperidol、quinidine hydrochloride、*dl*-sotalol hydrochloride、diltiazem hydrochloride、verapamil hydrochloride、chlorpheniramine maleate salt、captopril、propranolol hydrochloride、nifedipine (以上 Sigma Chemical Co.)、cisapride (中外製薬(株)にて抽出)、E-4031 hydrochloride (和光純薬工業(株)) を使用した。astemizole、bepidil、cisapride、haloperidol、quinidine、*dl*-sotalol、chlorpheniramine、verapamil、captopril は遮光・気密容器にて室温保存し、terfenadine、E-4031、diltiazem、propranolol、nifedipine は遮光・気密容器にて冷蔵保存した。

E 統計学的解析

3 例以上得られたデータについて平均値±標準誤差として表した(2 例以下の場合には不採用)。

麻酔モルモットの実験では、各パラメータについて各群の投与前値に差があるか確認するため一元配置分散分析を行った。各被験物質の作用の検出に関しては、投与前値を対照とした各測定ポイントの反復測定時間に対する多重比較検定を行った。

麻酔イヌ及び覚醒マーモセットの実験では、各補正式にて算出した QTc 間隔を RR 間隔に対してそれぞれプロットし、回帰分析を行い、回帰直線式を求めた。その回帰直線の傾きが最も小さく、直線回帰式の CV 値が 10%以内である補正式を、RR 間隔に影響されにくい QT 補正式であると判断した。なお、覚醒マーモセットの実験では、回帰直線の傾きについて各補正式間で Tukey の多重比較検定を行った。また、被験物質投与の実験では、2 群間の比較では、各測定ポイントにおける各被験物質投与群と溶媒対照投与群の間で対応のない t 検定を行った。検定に際しては、F 検定により分散の検定を行い、等分散性が得られた場合には Student の t 検定を、等分散性が得られない場合には Aspin-Welch の t 検定を行った。3 群以上の比較では、各測定ポイントにおける各被験物質投与群と溶媒対照投与群の間で Bartlett 検定により分散の検定を行い、等分散性が得られた場合にはパラメトリックな Dunnett 検定を、等分散性が得られない場合にはノンパラメトリックな Dunnett 検定を行った。

統計学的解析ソフトとして Intranet SAS Version 8.2 (SAS Institute) を使用し、有意水準はいずれも $\text{probability}(p)<0.05$ とした。

III 実験結果

A 麻酔モルモットにおける薬物の MAP 持続時間に対する作用

小動物を用いた薬剤評価の対象動物としてはマウス、ラットなどのげっ歯類が一般的に用いられているが、げっ歯類では一過性外向き K 電流を引き起こす I_{to} チャンネルが再分極過程を主に制御しており、 I_{Kr} チャンネルの関与が少ないため、薬剤誘発性 QT 延長リスク評価の対象動物として不適と考えられている (ICH S7B, 2005)。一方、モルモットは I_{Kr} チャンネルが発現しており (Wymore *et al.*, 1997)、 I_{Kr} チャンネルの阻害により QT 間隔が延長することが示されている (De Clerck *et al.*, 2002)。また、小動物であることから必要化合物量も少なく、創薬早期の QT 延長評価を目的とした動物種として適していると考えられる。MAP は電極の心筋への押し付け (または吸引) により局所的に脱分極した傷害部位と健常部位との間に電位勾配が生じることによって記録され、電極周囲半径 5 mm 前後までの心筋の電気現象を反映すると考えられている (安野および外山, 1996)。MAP は薬剤誘発性 QT 延長作用に対して高感度に検出可能な指標として麻酔イヌにおいて検討されてきたが (Sugiyama *et al.*, 1997; Sugiyama & Hashimoto, 1998; Usui *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 1999)、麻酔モルモットにおける検討は非常に少なく (Carlsson *et al.*, 1997)、また、QT 延長リスク評価を目的とした大規模なバリデーション評価は行われていない。本研究では、陽性対照薬 8 種および陰性対照薬 4 種を用いて薬剤の反応性について評価し、さらに各薬剤の臨床結果と比較することにより本試験系の薬剤誘発性 QT 延長評価における有用性について検討した。

1 陽性対照薬の作用

図 1 に心電図と MAP の波形を示した。心電図は心臓内での興奮の発生（脱分極）・消失（再分極）と興奮波の伝導で成り立っており、P 波は心房筋の興奮から再分極まで、QRS 波は心室筋の興奮、T 波は興奮した心室筋の再分極を表している。Q 波の始点から T 波の終点までの時間が QT 間隔であり、心室筋の脱分極から再分極までの活動電位持続時間を表す。心電図第 II 誘導の T 波は多くの動物種で陽性を示すが、モルモットの T 波は陰性であることが報告されており（Provan *et al.*, 2005; Shiotani *et al.*, 2007）、本試験においても陰性 T 波を示した。第 II 誘導の電気軸では多くの動物種において再分極は心外膜から生じることにより陽性 T 波を示すが、モルモットでは再分極が心内膜側から生じることにより陰性 T 波を示すと推察される。本試験では心室筋心外膜の MAP を心筋活動電位持続時間の指標としたが、Q 波始点と MAP の始点、及び T 波終点と MAP の終点はそれぞれほぼ一致しており（図 1）、MAP 持続時間を指標とすることに問題はないと考えられた。

溶媒対照群を含むすべての実験群の各測定パラメータの投与前値について一元配置分散分析を行った結果、いずれの測定パラメータにも群間に有意差は認められなかった。溶媒対照である 1% 乳酸では $MAP_{90(\text{sinus})}$ （洞調律下で活動電位振幅が最大値の 90% まで再分極する時間）、 $MAP_{90(\text{pacing})}$ （ペーシング刺激下で活動電位振幅が最大値の 90% まで再分極する時間）及び心拍数に影響は認められなかった（表 1）。1% 乳酸の同一個体への 5 回の投与（個体数：5 例）により計 25 ポイントの測定値が得られ、心拍数変動の影響を除いた真の再分極時間の指標となる $MAP_{90(\text{pacing})}$ の投与前値からの変化率は -3.4~2.7% であった。したがって、 $MAP_{90(\text{pacing})}$ に対する薬物の作用の有無については、統計学的有意差

に加えて、5例の平均値で5%以上の変化が認められた場合に「作用あり」と判断し、その場合に被験物質に「QT延長作用あり」と判断した。

陽性対照薬である haloperidol の 10 $\mu\text{mol/kg}$ の投与により、QT 間隔及び $\text{MAP}_{90(\text{sinus})}$ の明らかな延長が認められた (図 1)。陽性対照薬 8 種はいずれも $\text{MAP}_{90(\text{sinus})}$ 及び $\text{MAP}_{90(\text{pacing})}$ に対して用量に応じた延長作用を示した (表 1)。各陽性対照薬の最高用量における $\text{MAP}_{90(\text{pacing})}$ 延長率は、E-4031 が 19.3%、cisapride が 16.0%、astemizole が 14.9% (1 $\mu\text{mol/kg}$)、terfenadine が 9.0%、bepidil が 6.3%、haloperidol が 20.5%、quinidine が 12.4%、*dl*-sotalol が 10.4% であり、いずれも閾値として設定した 5% 以上の延長作用を示した (図 2)。なお、E-4031 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ の 1 例、terfenadine 0.3、1 $\mu\text{mol/kg}$ のそれぞれ 1 例、haloperidol 10 $\mu\text{mol/kg}$ の 2 例、astemizole 3 $\mu\text{mol/kg}$ の 3 例では、ペーシングがかからなかったため $\text{MAP}_{90(\text{pacing})}$ のデータが採取できなかった。ペーシングがかからなかった原因は、terfenadine についてはペーシング刺激頻度よりも心拍数が高くなったため、それ以外については不応期がペーシング刺激間隔よりも長くなったためと推察された。

心拍数に対しては、terfenadine 以外の陽性対照薬において用量に応じた低下作用が認められた (表 1)。

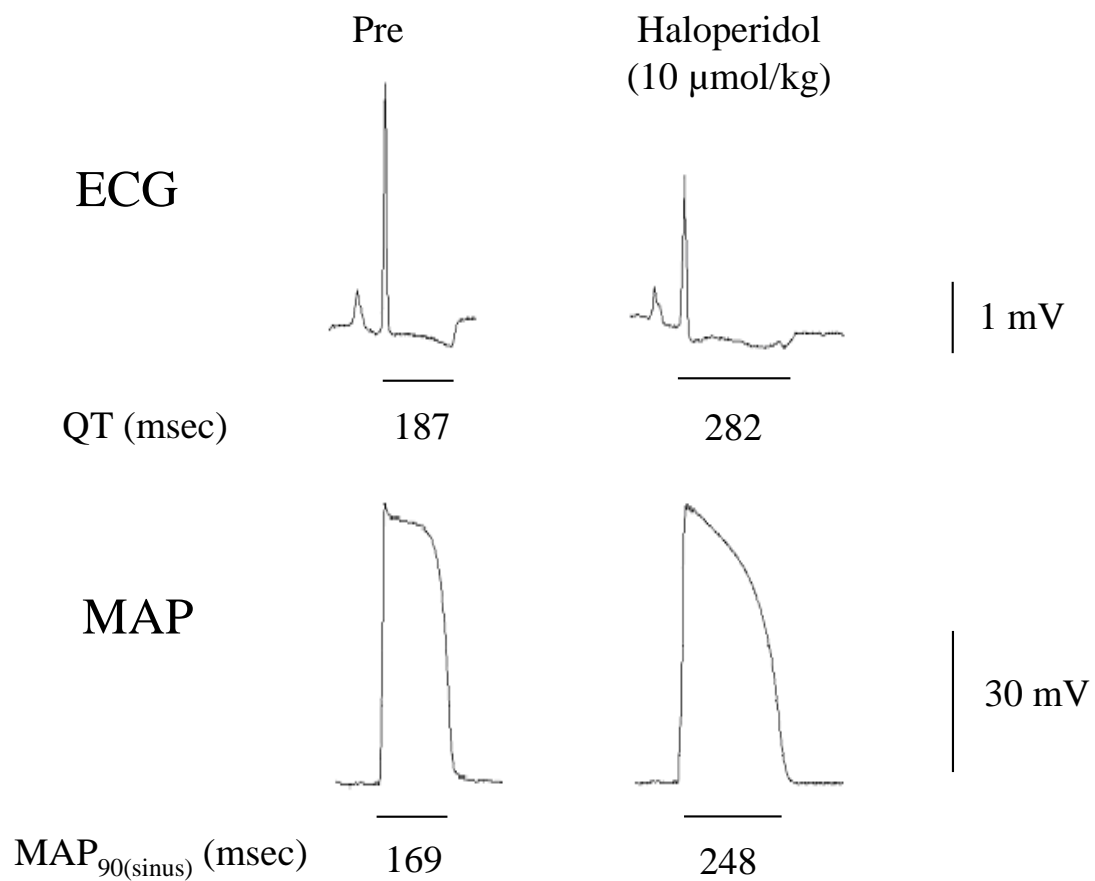


図1 麻酔モルモットにおける洞調律下での haloperidol 静脈内投与前 (Pre) 及び 10 $\mu\text{mol/kg}$ 投与後の心電図 (ECG) および単相性活動電位 (MAP) の典型的波形

それぞれの QT 間隔および MAP の 90%再分極時間 (MAP_{90(sinus)}) を各波形の下に示した。

表 1 麻酔モルモットにおける陽性対照薬の洞調律下の心拍数及び单相性活動電位持続時間 (MAP_{90(sinus)})、ペーシング刺激下の单相性活動電位持続時間 (MAP_{90(pacing)}) に対する作用

Treatment (μmol/kg)	Parameters	Baseline	Administrations of test drug				
			1st	2nd	3rd	4th	5th
Vehicle	Dose		-	-	-	-	-
	MAP _{90(sinus)}	169 ± 4	169 ± 4	171 ± 4	172 ± 4	171 ± 5	172 ± 5
	MAP _{90(pacing)}	163 ± 3	162 ± 3	163 ± 3	163 ± 4	163 ± 3	163 ± 4
	Heart rate	222 ± 6	215 ± 6	212 ± 7	210 ± 8	211 ± 9	211 ± 9
E-4031 (0.001 - 0.1)	Dose		0.001	0.003	0.01	0.03	0.1
	MAP _{90(sinus)}	166 ± 3	172 ± 2	177 ± 2 *	190 ± 3 **	209 ± 4 **	231 ± 4 **
	MAP _{90(pacing)}	162 ± 4	165 ± 3	168 ± 3 **	176 ± 3 **	184 ± 3 **	194 ± 5 **
	Heart rate	216 ± 6	212 ± 8	207 ± 5	199 ± 5 **	182 ± 2 **	162 ± 3 **
Cisapride (0.01 - 1)	Dose		0.01	0.03	0.1	0.3	1
	MAP _{90(sinus)}	169 ± 2	173 ± 2	178 ± 2 *	184 ± 3 **	202 ± 3 **	228 ± 5 **
	MAP _{90(pacing)}	164 ± 2	166 ± 2	168 ± 1	173 ± 1 **	181 ± 1 **	190 ± 2 **
	Heart rate	217 ± 6	211 ± 6	205 ± 8 *	205 ± 7 *	190 ± 8 **	164 ± 6 **
Astemizole (0.03 - 3)	Dose		0.03	0.1	0.3	1	3
	MAP _{90(sinus)}	169 ± 5	174 ± 6	180 ± 9	197 ± 10 **	217 ± 10 **	232 ± 10 **
	MAP _{90(pacing)}	163 ± 5	166 ± 5	171 ± 6 *	179 ± 7 **	188 ± 7 *	
	Heart rate	218 ± 6	213 ± 7	212 ± 10	196 ± 9 *	178 ± 8 **	163 ± 9 **
Terfenadine (0.03 - 3)	Dose		0.03	0.1	0.3	1	3
	MAP _{90(sinus)}	171 ± 4	172 ± 5	174 ± 5	173 ± 6	178 ± 7	195 ± 6 **
	MAP _{90(pacing)}	164 ± 4	165 ± 4	166 ± 4	167 ± 5 **	171 ± 5 **	179 ± 5 **
	Heart rate	206 ± 5	205 ± 3	203 ± 2	211 ± 9	205 ± 9	186 ± 3
Bepridil (0.03 - 3)	Dose		0.03	0.1	0.3	1	3
	MAP _{90(sinus)}	171 ± 5	173 ± 5	176 ± 7	179 ± 6 **	187 ± 6 **	204 ± 8 **
	MAP _{90(pacing)}	164 ± 5	163 ± 5	164 ± 6	166 ± 6	168 ± 6 *	174 ± 7 **
	Heart rate	214 ± 8	208 ± 7	207 ± 7	202 ± 6 *	193 ± 6 **	177 ± 6 **
Haloperidol (0.1 - 10)	Dose		0.1	0.3	1	3	10
	MAP _{90(sinus)}	172 ± 5	180 ± 5	189 ± 5 **	207 ± 6 **	234 ± 9 **	249 ± 7 **
	MAP _{90(pacing)}	166 ± 5	169 ± 5	174 ± 5 **	183 ± 6 **	193 ± 6 **	204 ± 7 **
	Heart rate	211 ± 5	200 ± 5	191 ± 5 **	176 ± 4 **	155 ± 5 **	139 ± 4 **
Quinidine (0.1 - 10)	Dose		0.1	0.3	1	3	10
	MAP _{90(sinus)}	174 ± 9	179 ± 9	185 ± 9 *	193 ± 10 **	208 ± 12 **	230 ± 14 **
	MAP _{90(pacing)}	167 ± 7	168 ± 6	170 ± 6	173 ± 6 **	179 ± 6 **	188 ± 7 **
	Heart rate	212 ± 7	204 ± 7	195 ± 8 **	187 ± 8 **	175 ± 10 **	157 ± 8 **
d/-Sotalol (0.1 - 10)	Dose		0.1	0.3	1	3	10
	MAP _{90(sinus)}	166 ± 3	167 ± 3	171 ± 3	177 ± 3 **	189 ± 4 **	208 ± 4 **
	MAP _{90(pacing)}	161 ± 3	162 ± 2	163 ± 2	165 ± 3 **	170 ± 3 **	178 ± 2 **
	Heart rate	215 ± 3	214 ± 5	209 ± 4	200 ± 4 *	185 ± 5 **	169 ± 4 **

各ポイントは平均値±標準誤差で示し、MAP_{90(pacing)}における E-4031 の 0.1 μmol/kg、terfenadine の 0.3 μmol/kg 及び 1 μmol/kg は 4 例、haloperidol の 10 μmol/kg は 3 例で、それ以外はすべてのパラメータにおいて 5 例であった。なお、astemizole の 3 μmol/kg の MAP_{90(pacing)} は 3 例未満であったため、表中に示さなかった。*: p<0.05, **: p<0.01; 各測定ポイントの投与前値に対する統計学的有意性を表す。

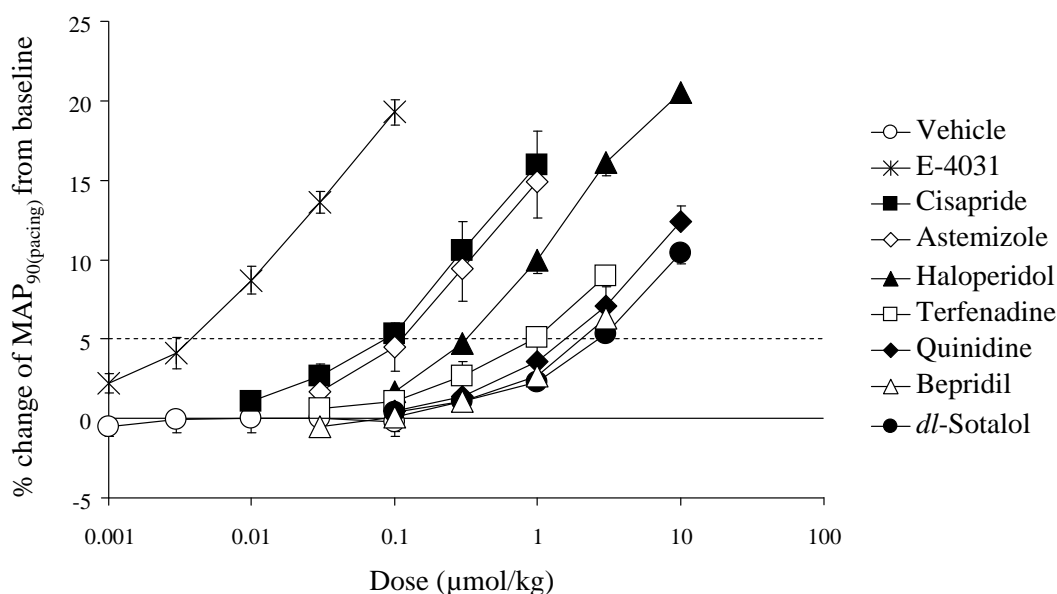


図2 麻酔モルモットにおける陽性対照薬のペースング刺激下单相性活動電位持続時間 (MAP_{90(pacing)}) に対する作用

溶媒対照の結果は 0.001~0.1 μmol/kg にプロットし、MAP_{90(pacing)}の 5% 延長率を破線で示した。各ポイントは平均値±標準誤差で示し、E-4031 の 0.1 μmol/kg、terfenadine の 0.3 μmol/kg 及び 1 μmol/kg は 4 例、haloperidol の 10 μmol/kg は 3 例で、それ以外は 5 例であった。なお、astemizole の 3 μmol/kg は 3 例未満であったため、図中に示さなかった。

2 陰性対照薬の作用

陰性対照薬の作用を表 2 に示す。Captopril はいずれのパラメータについても 30 μmol/kg まで影響を与えなかった。Diltiazem は 0.1 μmol/kg から心拍数の減少、0.3 μmol/kg から MAP_{90(sinus)}の延長を示したが、心拍数の変動要因を除いた MAP_{90(pacing)}には影響を与えなかった。Verapamil では MAP_{90(sinus)}に影響は認められなかったが、0.3 μmol/kg において心拍数の減少と MAP_{90(pacing)}の僅かな短縮が認められた。Chlorpheniramine では 1 μmol/kg から心拍数の減少および MAP_{90(sinus)}の延長が認められた。さらに 3 及び 10 μmol/kg において MAP_{90(pacing)}

の僅かな延長が認められたが、それぞれ 1.8%、3.1%の延長であり、基準として設定した 5%未満の反応であった。したがって、陰性対照薬 4 種はいずれも MAP_{90(pacing)}に対して 5%以上の延長作用を示さず (図 3)、いずれも「QT 延長作用なし」と判断した。

表 2 麻酔モルモットにおける陰性対照薬の洞調律下の心拍数及び単相性活動電位持続時間 (MAP_{90(sinus)})、ペーシング刺激下の単相性活動電位持続時間 (MAP_{90(pacing)}) に対する作用

Treatment (μmol/kg)	Parameters	Baseline	Administrations of test drug				
			1st	2nd	3rd	4th	5th
Vehicle	Dose		-	-	-	-	-
	MAP _{90(sinus)}	169 ± 4	169 ± 4	171 ± 4	172 ± 4	171 ± 5	172 ± 5
	MAP _{90(pacing)}	163 ± 3	162 ± 3	163 ± 3	163 ± 4	163 ± 3	163 ± 4
	Heart rate	222 ± 6	215 ± 6	212 ± 7	210 ± 8	211 ± 9	211 ± 9
Diltiazem (0.03 - 3)	Dose		0.03	0.1	0.3	1	3
	MAP _{90(sinus)}	169 ± 2	172 ± 2	175 ± 2	181 ± 4 **	185 ± 4 **	180 ± 7 **
	MAP _{90(pacing)}	165 ± 2	165 ± 2	165 ± 2	166 ± 2	166 ± 2	
	Heart rate	228 ± 6	223 ± 5	216 ± 7 *	200 ± 8 **	190 ± 9 **	188 ± 12 **
Verapamil (0.03 - 3)	Dose		0.03	0.1	0.3	1	3
	MAP _{90(sinus)}	167 ± 3	166 ± 2	171 ± 3	172 ± 5		
	MAP _{90(pacing)}	161 ± 2	161 ± 2	160 ± 1	157 ± 2 **		
	Heart rate	227 ± 5	227 ± 5	214 ± 8	199 ± 11 *		
Chlorpheniramine (0.1 - 10)	Dose		0.1	0.3	1	3	10
	MAP _{90(sinus)}	170 ± 5	171 ± 6	175 ± 7	180 ± 8 *	185 ± 9 **	195 ± 11 **
	MAP _{90(pacing)}	163 ± 5	163 ± 5	163 ± 5	164 ± 5	166 ± 6 **	168 ± 6 **
	Heart rate	217 ± 5	217 ± 5	209 ± 6	200 ± 7 **	195 ± 7 **	180 ± 8 **
Captopril (0.3 - 30)	Dose		0.3	1	3	10	30
	MAP _{90(sinus)}	171 ± 4	171 ± 4	170 ± 6	172 ± 4	170 ± 5	169 ± 5
	MAP _{90(pacing)}	164 ± 3	163 ± 3	162 ± 3	162 ± 3	162 ± 3	161 ± 3
	Heart rate	211 ± 6	207 ± 6	210 ± 10	205 ± 6	209 ± 8	209 ± 8

各ポイントは平均値±標準誤差で示し、diltiazem の 3 μmol/kg の心拍数および MAP_{90(sinus)}は 4 例で、それ以外はすべてのパラメータにおいて 5 例であった。なお、diltiazem の 3 μmol/kg の MAP_{90(pacing)}、verapamil の 1 μmol/kg 及び 3 μmol/kg のすべてのパラメータは 3 例未満であったため、表中に示さなかった。*: p<0.05, **: p<0.01; 各測定ポイントの投与前値に対する統計学的有意性を表す。

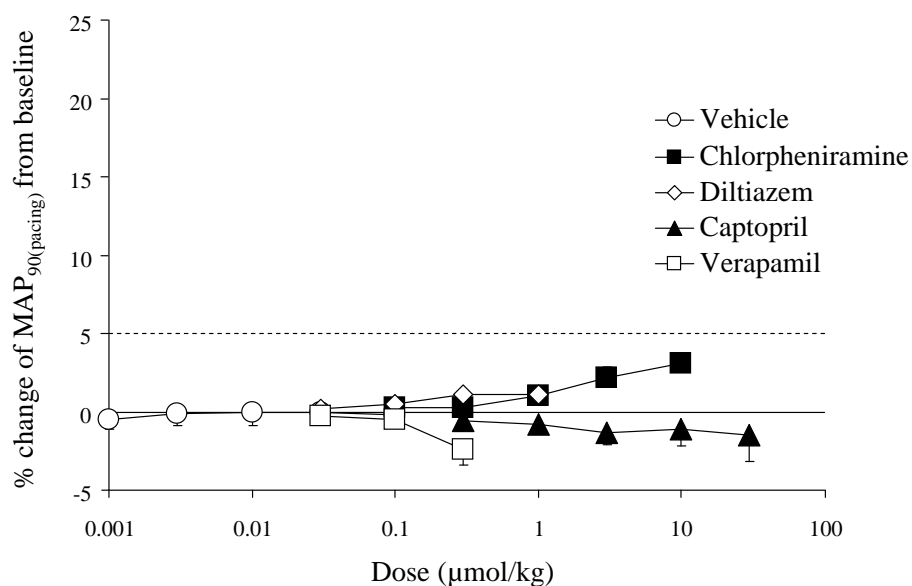


図3 麻酔モルモットにおける陰性対照薬のペーシング刺激下单相性活動電位持続時間 ($MAP_{90(pacing)}$) に対する作用

溶媒対照の結果は $0.001 \sim 0.1 \mu\text{mol/kg}$ にプロットし、 $MAP_{90(pacing)}$ の 5% 延長率を破線で示した。各ポイントは平均値 \pm 標準誤差で示した (5 例)。なお、diltiazem の $3 \mu\text{mol/kg}$ 、verapamil の $1 \mu\text{mol/kg}$ 及び $3 \mu\text{mol/kg}$ は 3 例未満であったため、図中に示さなかった。

3 陽性対照薬の $MAP_{90(pacing)}$ 延長作用と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較

陽性対照薬 8 種の $MAP_{90(pacing)}$ 延長作用に対する力価 (推定 5% 延長用量: ED_5) と臨床において QT 延長作用を引き起こす濃度 (Baker *et al.*, 1983; Manouvrier *et al.*, 1986; Monahan *et al.*, 1990; Funck-Brentano, 1993; Katritsis *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 1998; van Haarst *et al.*, 1998; Desai *et al.*, 2003) との間に良好な相関が認められた ($R^2=0.7214$) (図 4A)。一方、hERG 抑制作用 (IC_{50}) (Guth *et al.*, 2004; Kirsch *et al.*, 2004) との間に相関は認められなかった ($R^2=0.2555$) (図 4B)。

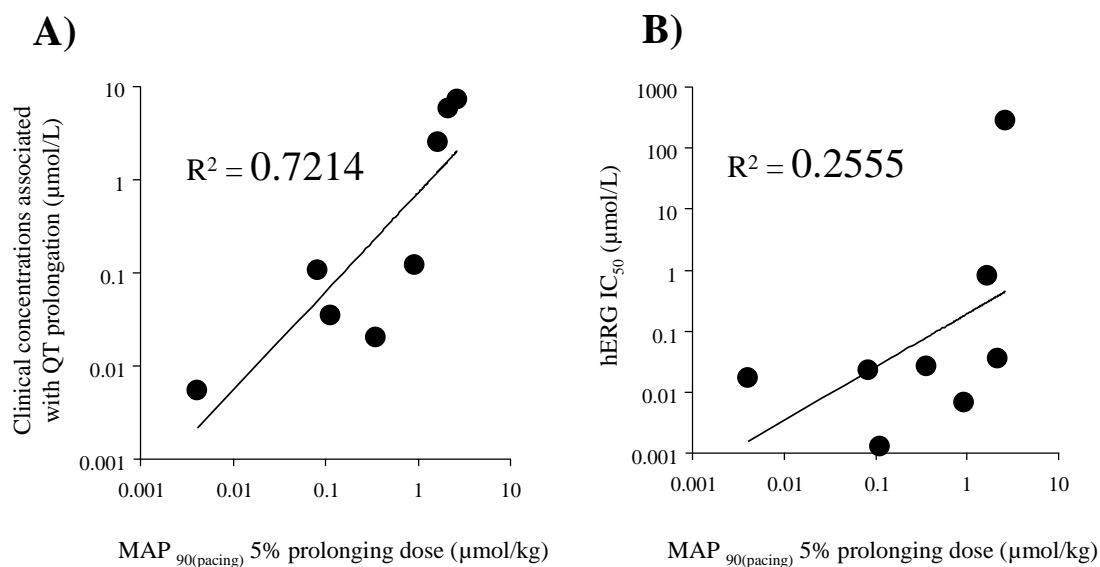


図4 麻酔モルモットにおける陽性対照薬のペーシング刺激下单相性活動電位持続時間 (MAP_{90(pacing)}) の延長作用と臨床における QT 延長作用 (A) あるいは hERG 抑制作用 (B) との相関

各薬剤の MAP_{90(pacing)} 延長作用は ED₅ として表し、また、臨床において QT 延長作用を示す血漿中濃度は Baker *et al.* (1983), Manouvrier *et al.* (1986), Monahan *et al.* (1990), Funck-Brentano (1993), Katritsis *et al.* (1997), Ikeda *et al.* (1998), van Haarst *et al.* (1998), Desai *et al.* (2003) を引用し、hERG IC₅₀ 値は Guth *et al.* (2004), Kirsch *et al.* (2004) を引用した。それぞれの回帰直線を実線で示し、回帰直線式の寄与率 (R^2) を図中に示した。

B 麻酔イヌにおける薬物の心房ペーシング刺激下での QT 間隔に対する作用

薬剤誘発性 QT 延長作用の薬剤評価において、イヌは最も一般的に使用されてきた動物種であり (Hammond *et al.*, 2001; Toyoshima *et al.*, 2005; Hanson *et al.*, 2006)、また、麻酔下における研究も広く行われてきた (Sugiyama *et al.*, 1997; Sugiyama & Hashimoto, 1998; De Clerck *et al.*, 2002; Tashibu *et al.*, 2005)。QT 間隔は心拍数 (あるいは RR 間隔) の変動により生理的に変化する性質があり、薬剤の心筋再分極時間に対する作用を正確に評価するためには心臓ペーシングをかけて心拍数を一定にすることや、QT 間隔を RR 間隔で補正する必要がある。しかしながら、心臓ペーシング刺激下での詳細な薬剤誘発性 QT リスク評価の検討は少なく、また、イヌにおける試験別補正式や個体別補正式などの詳細な QT 補正式の検討は覚醒下のテレメトリー試験において進められてきたが (Spence *et al.*, 1998; Miyazaki & Tagawa, 2002)、麻酔下の評価では Fridericia や Van de Water などの一般補正式が使用されており (Fridericia, 1920; Van de Water *et al.*, 1989)、QT 補正式に関する詳細な検討は行われていない。そこで、本研究では麻酔イヌに心房ペーシング刺激をかけて心拍数を一定にした条件下で薬剤検討を行うとともに、薬剤未処置下において心房ペーシングにより幅広い QT 間隔と RR 間隔の関係を求めて新規 QT 補正式を作成し、その補正式を用いて薬剤の反応性を評価し、臨床結果との比較により本試験系の薬剤誘発性 QT 延長評価における有用性について検討した。

1 QT 補正式に関する検討

QT 間隔は RR 間隔に対して正の相関を示し、RR 間隔が長くなるにつれ QT

間隔が延長する性質を示した (図 5)。本試験系における最適な QT 補正式を求めため、一般補正式である Bazett、Fridericia、Van de Water、Matsunaga 及び試験別補正式について RR 間隔に対する補正 QT 間隔の回帰直線を求めた (図 6)。その結果、Bazett の補正式では、RR 間隔が短くなる (心拍数が高くなる) と QTcB 間隔が過剰補正され高い値を示し、逆に RR 間隔が長くなる (心拍数が低くなる) と QTcB 間隔は低い値を示す傾向を示した。Fridericia、Van de Water、Matsunaga では、Bazett とは異なり、RR 間隔が短くなると QTc 間隔は低い値を示し、RR 間隔が長くなると QTc 間隔が高い値を示す傾向を示した。試験別補正式では、回帰直線の傾きは -0.0092 であり、Bazett (-0.0913)、Fridericia (0.0273)、Van de Water (0.1142)、Matsunaga (0.1174) と比較して傾きが 0 に近く、試験別補正式を用いて算出した QTcX 間隔 ($QTcX=QT/RR^{0.3879}$) が最も RR 間隔の影響を受けにくく、最適な補正式であることが示された。なお、いずれの回帰式においても、CV 値は 10% 未満であり (図 6)、回帰直線の精度に問題はなかった。

以上より、試験別補正式が最も良好な補正能を示したため、被験物質を用いた検討では、試験別補正式を用いて QT 間隔の RR 間隔に対する補正を行った。

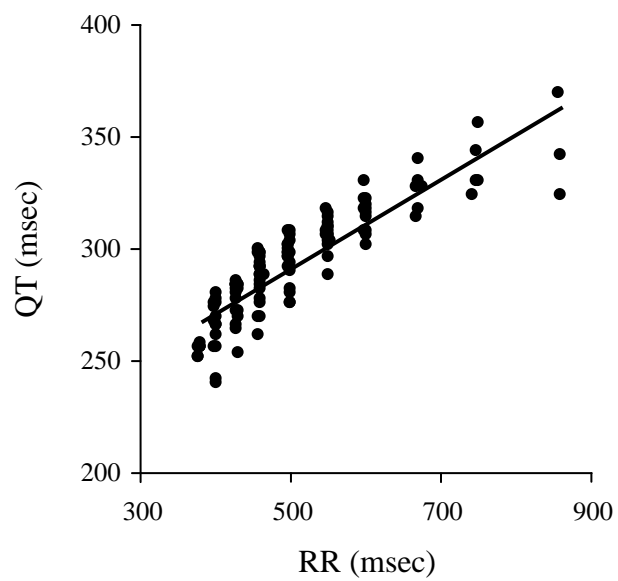


図 5 麻酔イヌにおけるペーシング刺激下の QT 間隔および RR 間隔の関係

各ポイントは 20 匹から得られた薬剤未処置下の QT 及び RR 間隔を示し、回帰直線を実線で表した。

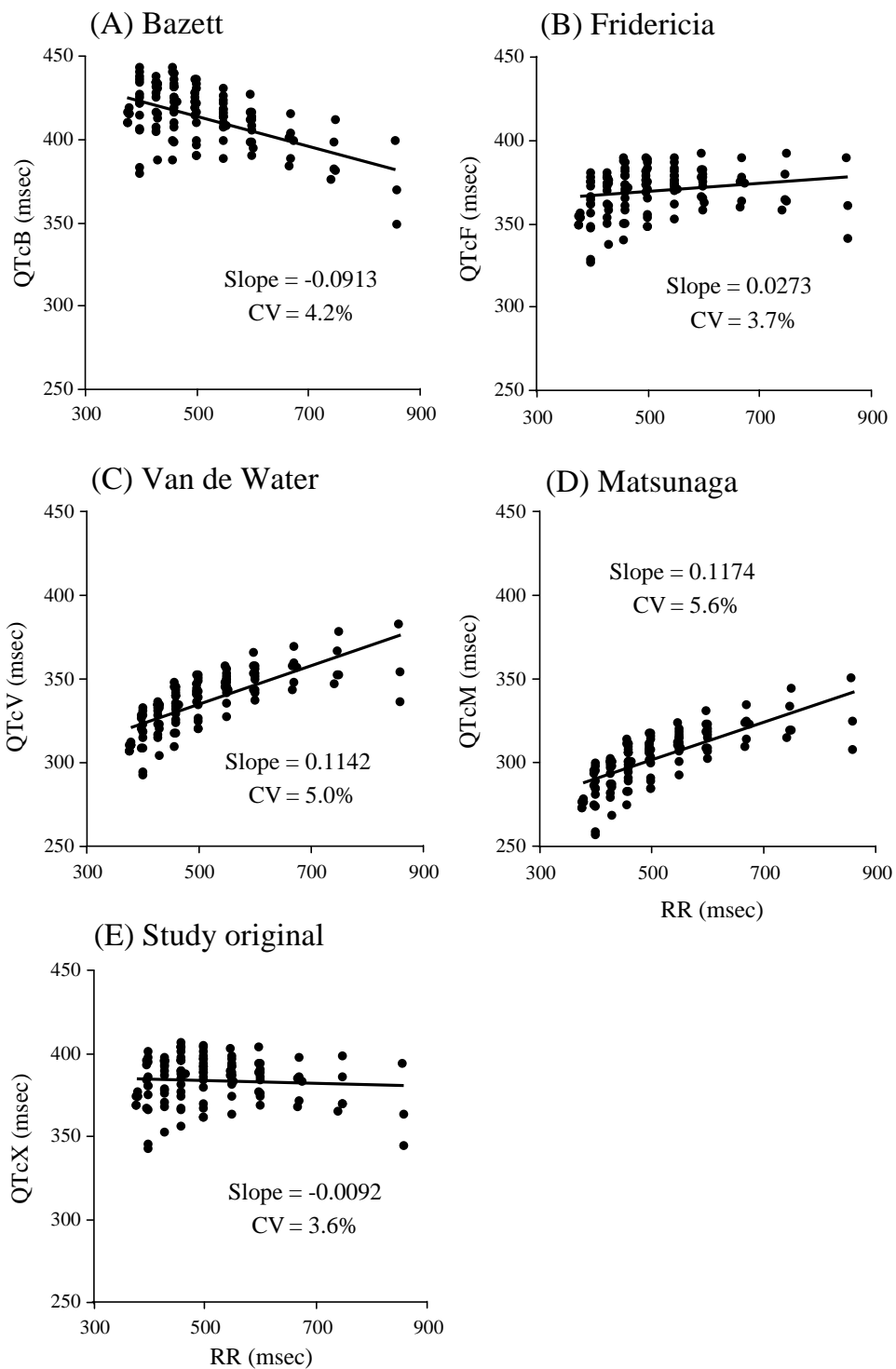


図6 麻酔イヌにおけるペーシング刺激下のRR間隔に対するQTc間隔

20匹から得られた薬剤未処置下のQT及びRR間隔を元に、Bazett (A)、Fridericia (B)、Van de Water (C)、Matsunaga (D) あるいは試験別補正式 (E) により補正されたQTc間隔を算出し、縦軸に示した。回帰直線を実線で表し、その傾き及びCV値を図中に示した。

2 陽性対照薬の作用

溶媒対照及び陽性対照薬の作用を図 7 に示す。溶媒対照である 1% 乳酸では QT 間隔、心拍数、QTc 間隔及び QT_(pacing) に影響は認められなかった。Astemizole (0.1~3 mg/kg) は、0.3 mg/kg から QT 間隔、QTc 間隔及び QT_(pacing) の延長作用を示した。なお、3 mg/kg では 1 mg/kg よりも QTc 間隔の延長の程度が小さくなり、用量反応性が認められなかったが、3 mg/kg 投与により T 波の波形が大きく変化し、見かけ上 QT 間隔が 1 mg/kg 投与時よりも短くなったことが原因であると推察された。一方、心拍数に対してはいずれの用量においても影響は認められなかった。血漿中濃度と薬剤の反応性の関係について評価するため、被験物質投与後の各測定ポイントにおける血漿中濃度を測定した結果、Astemizole の 0.1、0.3、1、3 mg/kg 投与時の最高血漿中濃度はそれぞれ 0.096±0.044、0.305±0.076、1.09±0.41、2.94±1.15 µM であった。

dl-Sotalol (0.15~5 mg/kg) では、0.5 mg/kg から QT 間隔及び QT_(pacing) の延長作用と QTc 間隔の延長傾向が認められ、1.5 mg/kg 以上で QT 間隔、QTc 間隔および QT_(pacing) の明らかな延長作用を示した。心拍数に対しては、0.15 mg/kg から低下作用を示したが、用量相関性は認められなかった。*dl*-sotalol の 0.15、0.5、1.5、5 mg/kg 投与時の最高血漿中濃度はそれぞれ 1.95±0.18、7.16±0.70、23.2±2.5、88.1±6.0 µM であった。なお、*dl*-sotalol の 5 mg/kg 投与開始後 20 分及び 30 分、astemizole の 1 mg/kg 投与開始後 20 分及び 30 分、さらに 3 mg/kg 投与では、QT 間隔の過剰の延長により、ペーシング刺激時の T 波終点が次の刺激により発生した P 波に重なり、T 波終点が特定できなかつたため、QT_(pacing) のデータは解析できなかつた。

3 陰性対照薬の作用

Propranolol は心拍数、QT 間隔、QTc 間隔及び QT_(pacing)に影響を与えなかった (図 7)。

4 QT 延長作用に対する反応性と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較

麻酔イヌにおいて astemizole 及び *dl*-sotalol が QT 延長作用を示した血漿中濃度と臨床において QT 延長作用を引き起こす濃度 (Hoppu *et al.*, 1991; Saviuc *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1996) はほぼ一致していた (表 3)。一方、hERG 抑制作用 (IC₅₀) との比較では、astemizole では作用濃度が近かったが、*dl*-sotalol では、QT 延長作用を示した血漿中濃度に比べて hERG 抑制作用を示す濃度が明らかに高かった (Zhou *et al.*, 1999; Kirsch *et al.*, 2004) (表 3)。

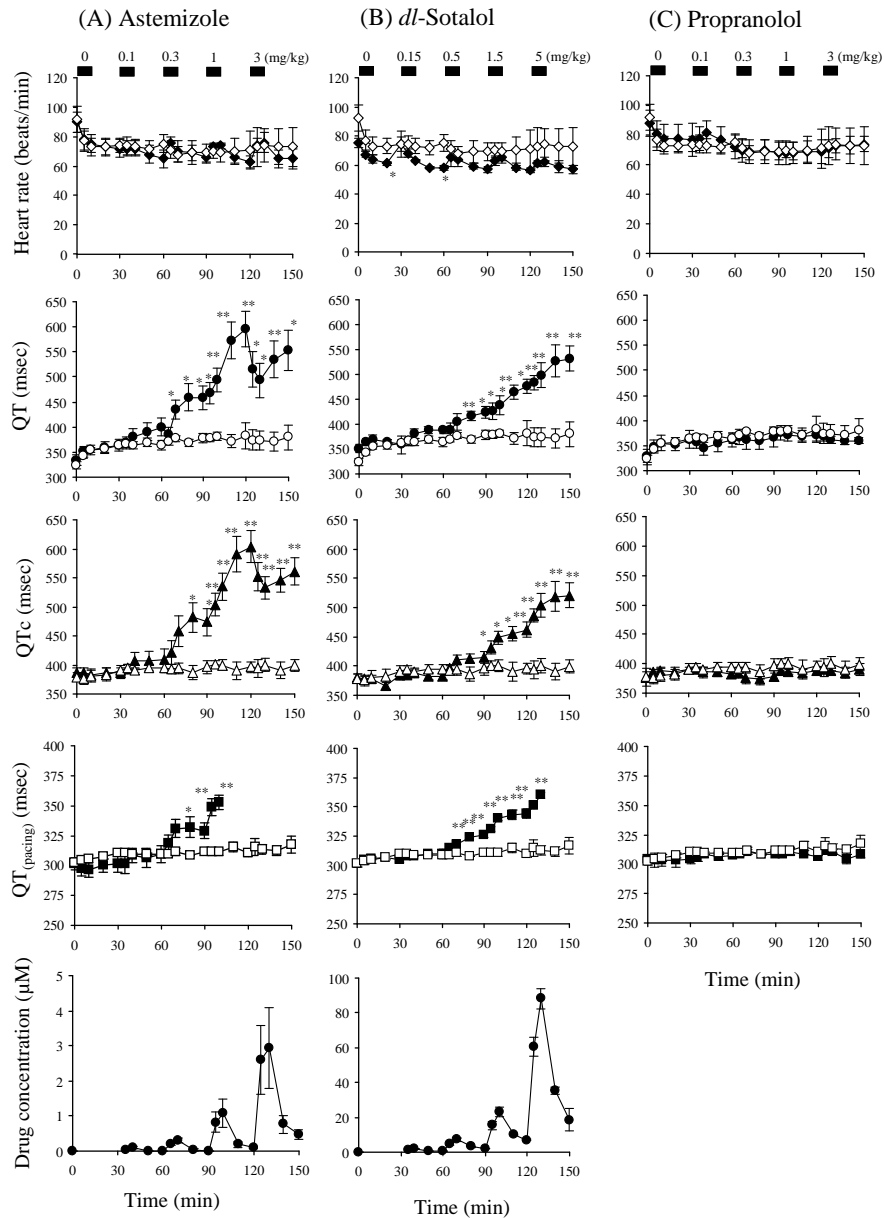


図7 麻酔イヌにおける astemizole (A)、*dl*-sotalol (B) あるいは propranolol (C) 静脈内投与時の心拍数、QT 間隔、QTc 間隔、QT_(pacing)、血漿中濃度の継時的変化

血漿中濃度推移は陽性対照薬である astemizole 及び *dl*-sotalol のみ示した。QTc 間隔は試験別補正式により補正した。溶媒対照群は白抜きで、被験物質群は黒抜きで示した。各ポイントは平均値±標準誤差で示し、astemizole の 100 分時点の QT_(pacing) (4 例) 以外は、溶媒対照群と *dl*-sotalol 群は 4 例、astemizole 群と propranolol 群は 5 例であった。なお、astemizole 群の 110 分時点およびそれ以降、*dl*-sotalol 群の 140 分及び 150 分時点における QT_(pacing) については、T 波終点が P 波始点に重なり解析できない個体があり、採用例が 3 例未満であったため、図中に示さなかった。*: p<0.05, **: p<0.01; 各測定ポイントにおける溶媒対照群と被験物質群間の統計学的有意性を表す。

表 3 麻酔イヌにおける被験物質の QT 延長作用と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較

Drugs	Total (μM)		Unbound (μM)	
	Plasma conc. at QT prolongation in dogs	Plasma conc. at clinical QT prolongation/TdP ^a	Plasma conc. at QT prolongation in dogs ¹	hERG ^a IC ₅₀
Astemizole	0.305	0.134–0.545 ^b	0.0092	0.0009 ^d
<i>dl</i> -Sotalol	7.16	5.54 ^c	7.16	278 ^e
Propranolol	–	–	–	3.9 ^f

¹ 蛋白結合率によりフリー体薬物濃度を算出した。Astemizole の蛋白結合率は 97% (Mann *et al.*, 1989)、*dl*-sotalol の蛋白結合率は 0% (Schnelle & Garrett, 1973) とした。

^a 文献値を引用 (^bHoppu *et al.*, 1991 及び Saviuc *et al.*, 1993, ^cKimura *et al.*, 1996, ^dZhou *et al.*, 1999, ^eKirsch *et al.*, 2004, ^fKawakami *et al.*, 2006)

–: No QT prolongation, ND: No data available

C テレメトリーマーモセットにおける薬物の QT 間隔に対する作用

マーモセットは小動物の霊長類であり、供給化合物量の少ない創薬早期における評価に適した動物種として期待されている。しかしながら、マーモセットでは薬剤誘発性 QT 延長作用の検出に関する報告はなく、マーモセットの QT 延長作用に対する薬剤反応性について検討する必要がある。また、本研究論文ではモルモット及びイヌを用いて麻酔下の研究結果を報告してきたが、覚醒下では自律神経系や循環器系の変化などの影響を含む評価が可能である。本研究では、テレメトリーシステムを用いて覚醒下のマーモセットの詳細な QT 間隔と RR 間隔の関係を求めてマーモセットに適した QT 補正式を作成し、さらにその補正式を用いて薬剤の反応性について評価して、臨床結果との比較により本試験系の薬剤誘発性 QT 延長評価における有用性について検討した。

1 QT 補正式に関する検討

QT 間隔は RR 間隔に対して正の相関を示した (図 8)。本試験系における最適な QT 補正式を求めるため、一般補正式である Bazett、Fridericia 及び個別別補正式について RR 間隔に対する補正 QT 間隔の回帰直線を求めた (図 9)。個別別補正式と Bazett の補正式における回帰直線の傾きはそれぞれ 0.0031、0.0054 であり、Fridericia の補正式の回帰直線の傾き (0.0690) よりも有意に小さく (表 4)、Fridericia の補正式よりも補正能が高いことが示された。個別別補正式と Bazett の補正式の回帰直線の傾きの間に統計学的な有意差は認められなかったが、個別別補正式の回帰直線の傾きは Bazett と比較して傾きが 0 に近く、さらに個体毎のばらつきもより小さかったため (表 4)、個別別補正式が最適な補正

式であることが考えられた。なお、いずれの回帰式においても、CV 値は 10% 未満であり（表 4）、回帰直線の精度に問題はなかった。

以上より、個別別補正式が最も良好な補正能を示すと考えられたため、被験物質を用いた検討では、個別別補正式を用いて QT 間隔の RR 間隔に対する補正を行った。

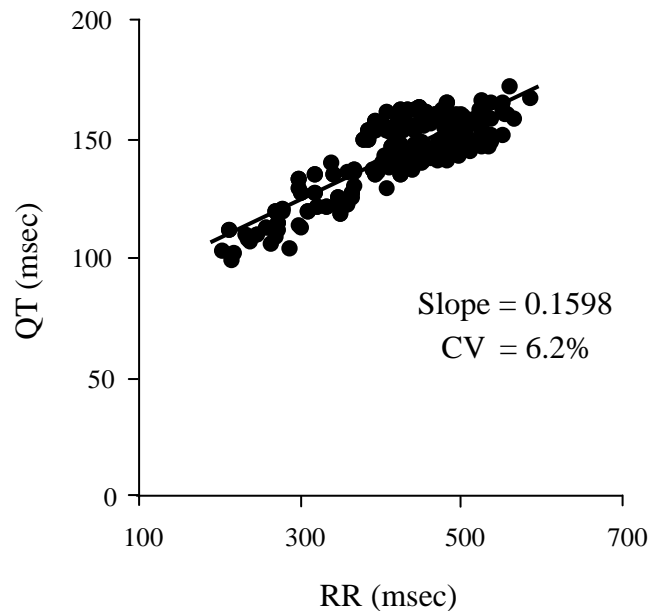


図 8 テレメトリーマーモセットにおける典型的な QT 間隔と RR 間隔の関係

各ポイントは、マーモセット 1 匹から得られた 24 時間の心電図について、6 分毎に連続した 10 個の心電図波形を解析し、その 10 波形の平均 QT 及び RR 間隔とした。QT 間隔を RR 間隔に対して表示し、回帰直線を実線で表した。表示したマーモセットの平均心拍数及び平均 QT 間隔は、それぞれ 144 beats/min (RR 間隔では 418 msec)、143 msec であった。

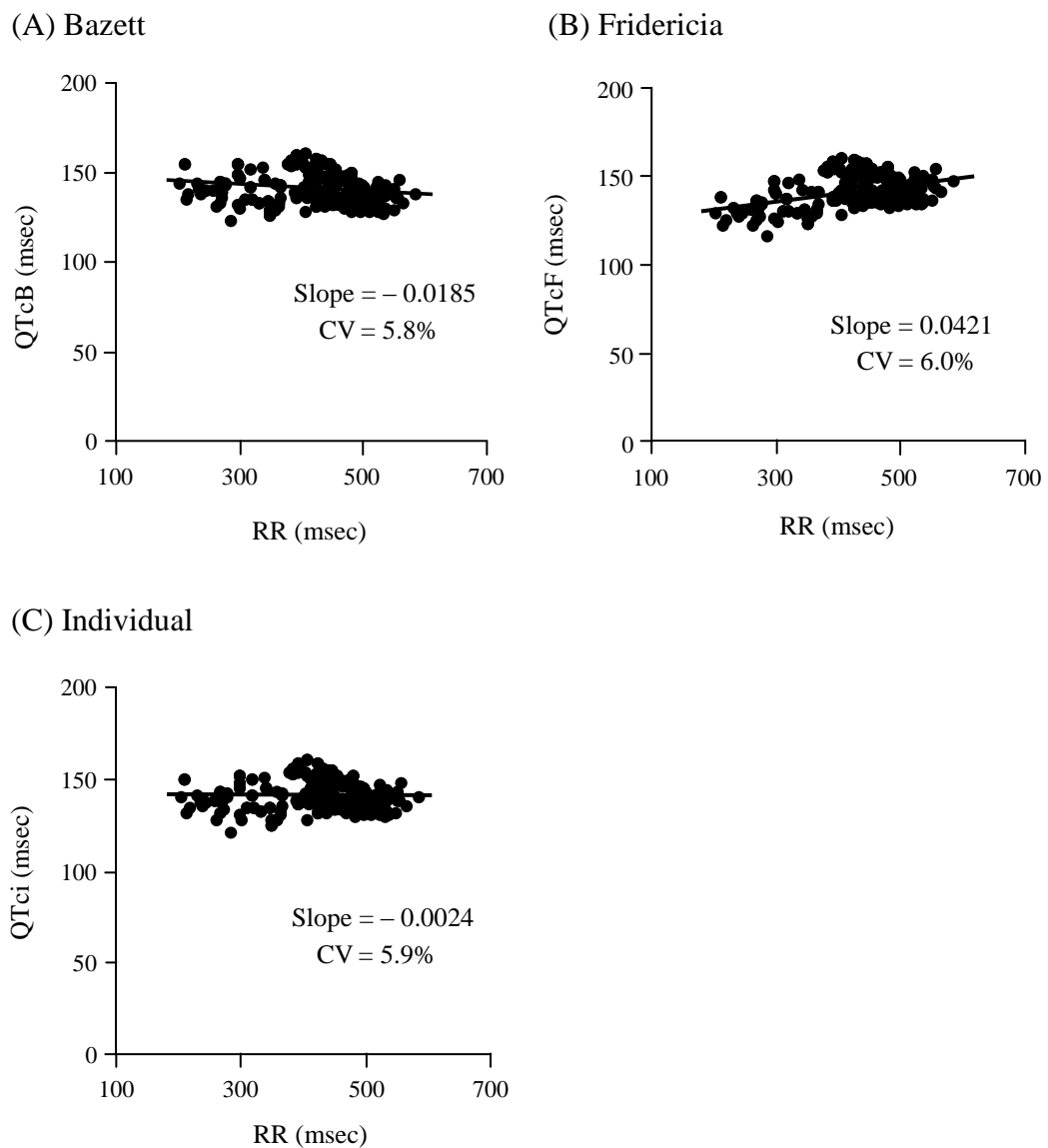


図9 テレメトリーマーモセットにおける典型的なRR間隔に対するQTc間隔

図8に使用したQT及びRR間隔を元にBazett (A)、Fridericia (B)あるいは個別補正式 (C)を用いてQTc間隔を算出し、QTc間隔をRR間隔に対して表示した。回帰直線を実線で表し、その傾き及びCV値を図中に示した。

表 4 テレメトリーマーモセットにおける Bazett、Fridericia あるいは個別補正式の QT 補正能

Parameters*	Bazett	Fridericia	Individual
Slope	0.0054 ± 0.0046 ^a	0.0690 ± 0.0067	0.0031 ± 0.0005 ^{a,b}
CV ^c (%)	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.1	6.6 ± 0.1

値は平均値±標準誤差で示した (4 例)。

*各個体の QTc-RR プロットから得られた回帰直線の傾き及び CV 値

^a Tukey の多重比較検定により Fridericia 補正式との有意差あり (P<0.01)

^b Tukey の多重比較検定により Bazett 補正式との有意差なし (P=0.9785)

^c 統計学的解析を実施していない

2 陽性対照薬の作用

陽性対照薬である astemizole の 30 mg/kg の投与により、QT 間隔の明らかな延長が認められた (図 10)。本試験に用いた 4 匹のマーモセットはすべて陽性 T 波であり、また T 波は尖鋭で T 波終点が特定されやすい性質を示した (図 10)。溶媒対照の投与では、いずれも投与直後に投与による動物の興奮の影響と考えられる一過性の心拍数上昇および QT 間隔の僅かな短縮が認められたが、QTc 間隔に影響は認められなかった (図 11)。溶媒対照と比較して、astemizole は 10 及び 30 mg/kg において QT 間隔及び QTc 間隔の延長作用を示し、最大反応を示した投与後 2 時間では、それぞれ投与前値に対して QT 間隔では 49、105 msec の延長、QTc 間隔では 48、98 msec の延長であった。一方、10、30 mg/kg ともに心拍数に影響は認められなかった。血漿中濃度と薬剤の反応性の関係について評価するため、最高血漿中濃度を含む測定ポイントについて血漿中濃度を測定した結果、astemizole 10 mg/kg 投与時の astemizole 及び desmethylastemizole の最高血漿中濃度はそれぞれ投与後 30 分で 0.025±0.018、0.268±0.250 µM であり、30 mg/kg 投与時は astemizole が投与後 30 分で 0.033±0.017 µM、

desmethylastemizole が投与後 2 時間で $0.403 \pm 0.176 \mu\text{M}$ であった。*dl*-Sotalol では、溶媒対照と比較して、5 mg/kg ではいずれのパラメータにも影響は認められなかったが、15 mg/kg において QT 間隔及び QTc 間隔の延長が認められ、最大反応を示した投与後 1 時間の QT 間隔と QTc 間隔は投与前値に対してそれぞれ 108 msec と 80 msec 延長した。一方、心拍数に対しては、5 mg/kg では影響は認められなかったが、15 mg/kg で僅かな低下作用が認められた。*dl*-Sotalol の 5 及び 15 mg/kg 投与時の最高血漿中濃度はそれぞれ投与後 1 時間で 3.90 ± 1.71 、 $5.29 \pm 2.42 \mu\text{M}$ であった。

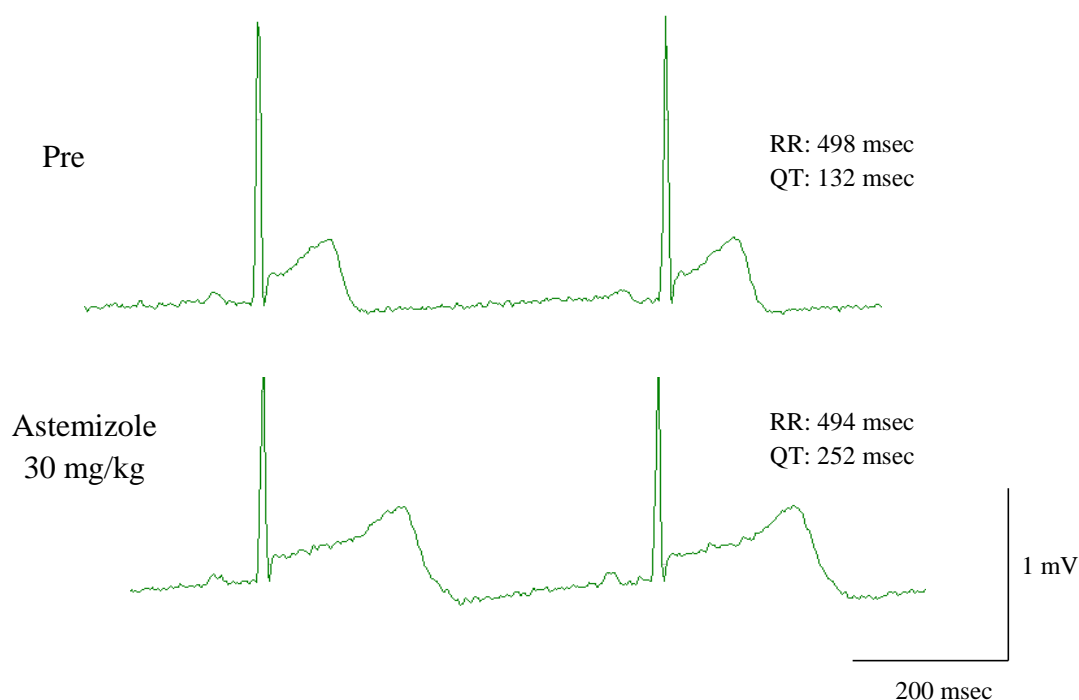


図 10 テレメトリーマーモセットにおける astemizole 経口投与前 (Pre) 及び 30 mg/kg 投与後 2 時間の典型的な心電図波形 (図 8 と同一個体)

各心電図波形の QT 及び RR 間隔を図中に表した。

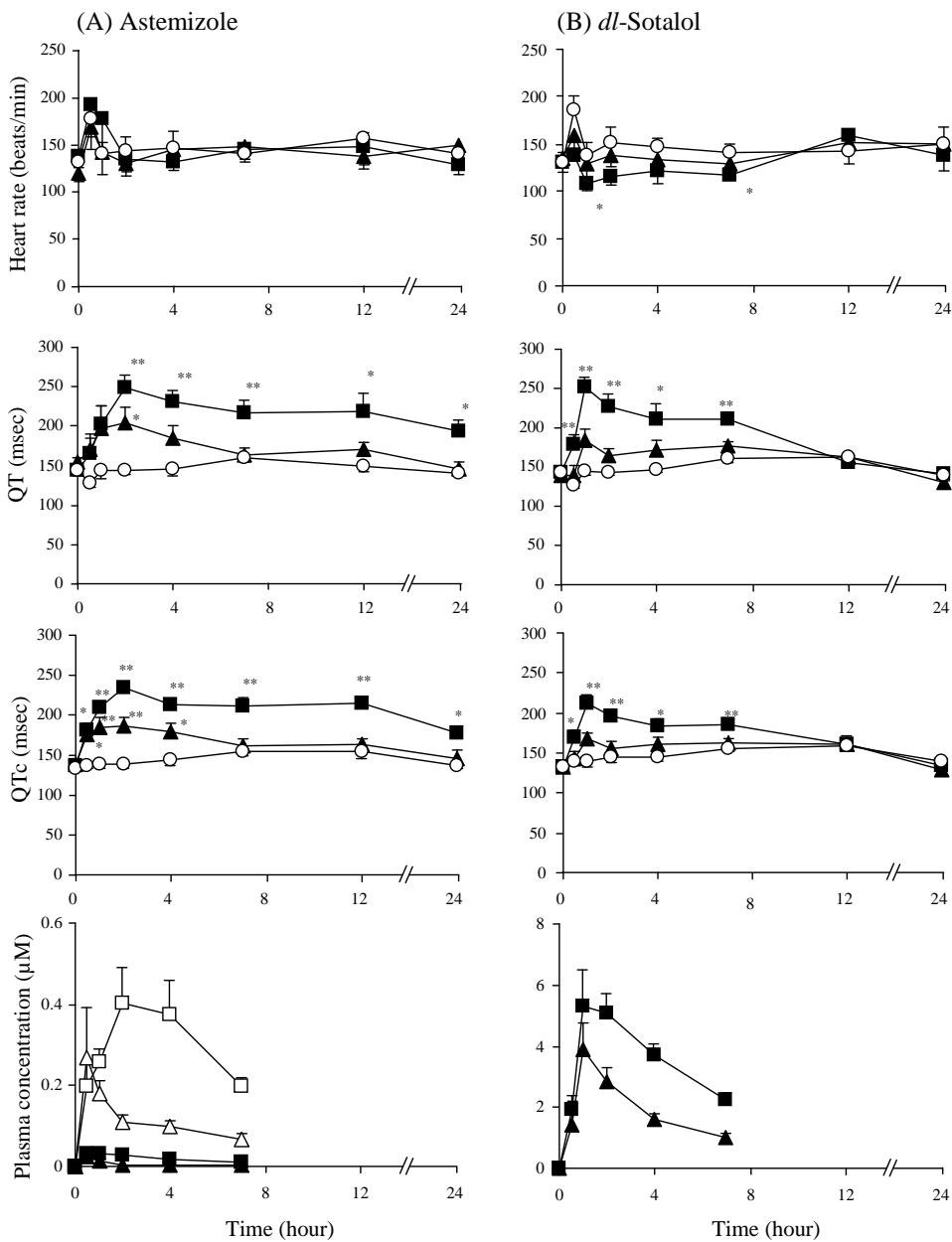


図 11 テレメトリーマーモセットにおける astemizole あるいは *dl*-sotalol 経口投与時の心拍数、QT 間隔、QTc 間隔および血漿中濃度の継時的変化

A に astemizole (▲:10 mg/kg; ■: 30 mg/kg)、B に *dl*-sotalol (▲: 5 mg/kg; ■: 15 mg/kg) の結果を示し、溶媒対照群は白抜き (○) で表示した。また、astemizole については血漿中濃度推移に astemizole の代謝物である desmethyastemizole (△: 10 mg/kg; □: 30 mg/kg) の結果を合わせて表示した。各ポイントは平均値±標準誤差で示した (4 例)。QTc 間隔は個体別補正式により補正した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; 各測定ポイントにおける溶媒対照群と被験物質群間の統計学的有意性を表す。

3 陰性対照薬の作用

Propranolol は 30 mg/kg において、QT 間隔、QTc 間隔、心拍数のいずれのパラメータに対しても影響を与えなかった (図 12)。Propranolol 投与後の最高血漿中濃度は $3.73 \pm 2.66 \mu\text{M}$ であり、臨床における薬効血漿中濃度の 30.3 倍の曝露であった (Rocher *et al.*, 1985)。一方、nifedipine は 30 mg/kg において心拍数の増加および QT 間隔の短縮を示したが、QTc 間隔には影響を与えなかった (図 12)。Nifedipine 投与後の最高血漿中濃度は $1.11 \pm 1.52 \mu\text{M}$ であり、臨床における薬効血漿中濃度の 5.2 倍の曝露であった (Zylber-Katz *et al.*, 1988)。

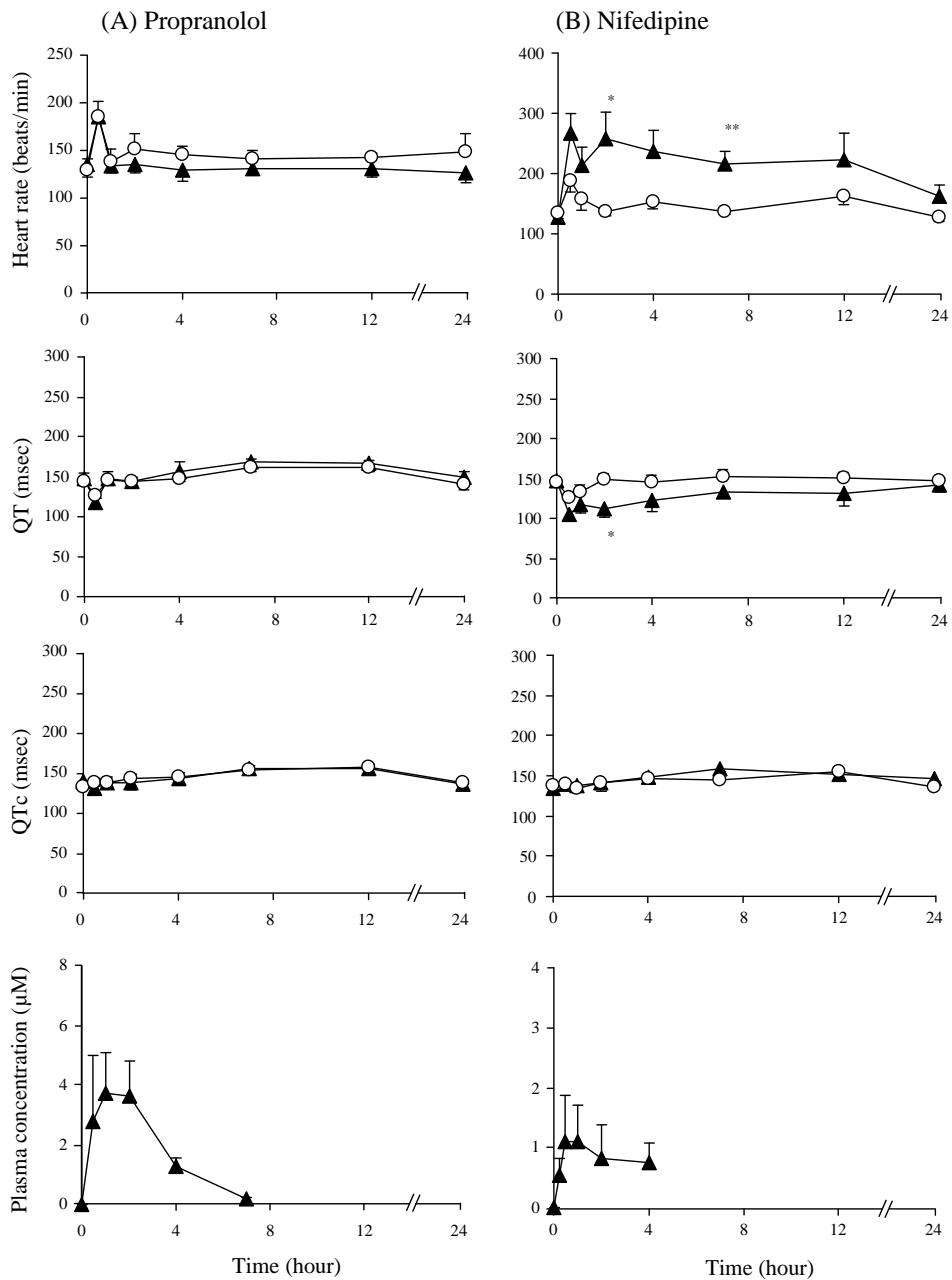


図 12 テレメトリーマーモセットにおける propranolol あるいは nifedipine 経口投与時の心拍数、QT 間隔、QTc 間隔および血漿中濃度の継時的変化

A に propranolol (\blacktriangle : 30 mg/kg)、B に nifedipine (\blacktriangle : 30 mg/kg) の結果を示し、溶媒対照群は白抜き (o) で表示した。各ポイントは平均値土標準誤差で示した (4 例)。QTc 間隔は個別補正式により補正した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; 各測定ポイントにおける溶媒対照群と被験物質群間の統計学的有意性を表す。

4 QT 延長作用に対する反応性と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較

マーモセットにおいて astemizole 及び *dl*-sotalol が QT 延長作用を示した血漿中濃度と臨床において QT 延長作用を引き起こす濃度 (Hoppu *et al.*, 1991; Saviuc *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1996) はほぼ一致していた (表 5)。一方、hERG 抑制作用 (IC₅₀) との比較では、astemizole では作用濃度が近かったが、*dl*-sotalol では、QT 延長作用を示した血漿中濃度に比べて hERG 抑制作用を示す濃度が明らかに高かった (Zhou *et al.*, 1999; Kirsch *et al.*, 2004) (表 5)。

表 5 テレメトリーマーモセットにおける被験物質の QT 延長作用と臨床における QT 延長作用あるいは hERG 抑制作用との比較

Drugs	Total (μM)		Unbound (μM)	
	Plasma conc. at QT prolongation in marmosets	Plasma conc. at clinical QT prolongation/ TdP ^a	Plasma conc. at QT prolongation in marmosets ¹	hERG ^a IC ₅₀
Astemizole combined ²	0.293	0.134–0.545* ^b		
Astemizole	0.025	ND	0.0003	0.0009 ^d
Desmethylastemizole	0.268	ND	0.009	0.001 ^d
<i>dl</i> -Sotalol	5.29	5.54 ^c	4.99	278 ^e
Propranolol	–	–	–	3.9 ^f
Nifedipine	–	–	–	>50 ^g

¹ 蛋白結合率によりフリー体薬物濃度を算出した。Astemizole、desmethylastemizole、*dl*-sotalol の蛋白結合率はそれぞれ 98.7%、96.5%、5.7%であった。

²Astemizole と desmethylastemizole の合計濃度

*モル濃度は astemizole の分子量から算出した。

^a文献値を引用した (^bHoppu *et al.*, 1991 and Saviuc *et al.*, 1993, ^cKimura *et al.*, 1996,

^dZhou *et al.*, 1999, ^eKirsch *et al.*, 2004, ^fKawakami *et al.*, 2006, ^gZhang *et al.*, 1999)

–: No QT prolongation, ND: No data available

IV 考察

本研究では、創薬早期における正確な QT 延長リスク評価に着目し、比較的少量の検体量で評価可能な麻酔モルモット、麻酔イヌ及びテレメトリーマーモセットを用いて QT 延長作用の検出に対して高感度で正確性の高い *in vivo* 評価法の開発を行った。麻酔モルモットでは、T 波よりも波形が単純で心筋再分極時間の終点を正確に検出することが可能な MAP 測定系を開発した。麻酔イヌでは、心筋活動電位持続時間に影響を与える心拍数の変動を除去する目的で右心房ペーシング刺激下における心電図測定系を開発し、さらに麻酔下における新規 QT 補正式を作成した。テレメトリーマーモセットでは、動物の日常生活に近い環境下における評価を目的として、動物にテレメトリー送信器を埋め込み、無麻酔無拘束下での心電図測定系を開発した。

QT 間隔や MAP 持続時間などの心筋活動電位持続時間は RR 間隔の影響を受けることが知られており、RR 間隔が延長するにつれて活動電位持続時間も延長するため一般的に両者は正の相関を示す。したがって、薬剤の心筋再分極時間に対する作用を正確に評価するためには心臓ペーシングをかけて心拍数を一定にすることや (Hamlin *et al.*, 2003)、QT 間隔を RR 間隔で補正する必要がある。本研究では、麻酔モルモット及び麻酔イヌの試験系は心房ペーシング下で実施し、麻酔イヌ及びテレメトリーマーモセットの試験系では適切な QT 補正式を求めて評価に使用した。QT 間隔の RR 間隔に対する補正に関しては、これまで Bazett や Fridericia などの一定の補正方法が臨床も含めて一般的に用いられてきた (Bazett, 1920; Fridericia, 1920)。しかしながら、試験条件が QT 間隔と RR 間隔の関係に与える影響は多数存在する。すなわち、動物種によりイオンチャンネル発現量やバランスが異なる場合 (Wymore *et al.*, 1997; Haverkamp *et al.*,

2000)、麻酔薬には hERG 抑制作用を有する薬剤もあり麻酔処置により薬剤の QT 間隔に対する作用力価が変化する場合 (Stadnicka *et al.*, 2000; Bachmann *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003)、麻酔深度により QT 間隔に影響を与える自律神経系の活性が変わる場合などがある (Harada *et al.*, 2005)。また、個体により QT 間隔と RR 間隔の関係が異なることも知られており、同一の補正式をすべての試験や個体に適用する場合、精度の低下に繋がると考えられ、近年、試験別あるいは個体別の個別補正方法 (Spence *et al.*, 1998; Miyazaki & Tagawa, 2002) が開発され、本研究では麻酔イヌ及びテレメトリーマーモセットに適用した。個別補正式は Bazett や Fridericia などの一般補正式よりも高い補正能を示したことから、両試験系における最適な補正方法となり、精度の高い試験系構築の一助となった。一般補正式を使用することは簡易であるが、例えば、麻酔イヌにおける Bazett の補正式では、RR 間隔が短くなる (心拍数が高くなる) と QTc 間隔が過剰補正され高値を示し、逆に RR 間隔が長くなる (心拍数が低くなる) と QTc 間隔は低値を示す傾向があり、心拍数を上昇させる薬物では Bazett の補正式では QTc 間隔が見かけ上延長しやすく、逆に心拍数を低下させる薬物では QTc 延長作用は見かけ上小さく評価されると考えられる。したがって、心拍数に影響を与える薬剤の場合、一般補正式の適用により過大評価や過小評価に繋がる可能性があり、正確性の高い評価系の構築には個別補正式の適用は必須と考えられた。

ペーシング刺激下あるいは個別補正式を用いて薬剤の反応性について検討した結果、いずれの試験系においても陽性対照薬は陽性反応、陰性対照薬は陰性反応を示し、いずれも感度 (陽性対照が陽性作用を示す比率)・特異度 (陰性対照が陰性作用を示す比率) とともに 100%であった。また、感度の精度については、麻酔モルモットでは陽性対照薬の $MAP_{90(pacing)}$ に対する ED_{50} と臨床におい

て QT 延長作用を示す濃度との間に良好な相関が認められ、麻酔イヌ及びテレメトリーマーモセットでは陽性対照薬に使用した薬剤の QT 延長作用を示す濃度が臨床データとほぼ一致した。これらのことから、本研究で確立した各試験系はいずれも正確性と精度がともに高い QT 延長評価系であることが明らかとなった。

陽性対照薬のうち astemizole 及び *dl*-sotalol については、今回開発した試験系のすべてにおいて評価を行い、両薬剤ともにいずれの試験系においても QT 延長作用を示した。血漿中薬物濃度測定を実施した麻酔イヌとテレメトリーマーモセットにおいて astemizole 及び *dl*-sotalol が QT 延長作用を示した濃度は、麻酔イヌではそれぞれ 0.305 μM 、7.16 μM 、テレメトリーマーモセットでは 0.293 μM 、5.29 μM であり、両試験系における反応性はほぼ一致していた。また、麻酔モルモットでは血漿中薬物濃度を測定していないが、astemizole の *dl*-sotalol に対する QT 延長作用の力価比は 23.6 倍 (astemizole の方が 23.6 倍強い) であり、麻酔イヌとテレメトリーマーモセットにおける力価比 (それぞれ 18.1 倍、23.5 倍) とほぼ同等であった。したがって、astemizole 及び *dl*-sotalol の反応性は各試験系においてほぼ一致していると考えられ、各試験系の薬剤反応性の相関性は高いと示唆された。

本試験に使用した陽性対照薬はいずれも hERG 抑制作用を有し (Kirsch *et al.*, 2004; Guth *et al.*, 2004)、それらの薬剤の QT 延長作用は hERG 抑制が原因であると考えられている (Redfern *et al.*, 2003)。しかしながら、麻酔モルモットでは hERG 抑制力価と $\text{MAP}_{90(\text{pacing})}$ 延長作用の力価に明確な相関は認められなかった。また、本研究において陰性対照薬として使用された verapamil (hERG IC_{50} =0.143~0.37 μM) (Zhang *et al.*, 1999; Kirsch *et al.*, 2004) や propranolol (hERG IC_{50} =3.9 μM) (Kawakami *et al.*, 2006) は、陽性対照薬として使用された *dl*-sotalol (hERG

IC₅₀=278 μM) (Kirsch *et al.*, 2004) よりも hERG 抑制作用が明らかに強いにもかかわらず、QT 延長作用を示さなかった。したがって、hERG 抑制作用と QT 延長作用は必ずしもイコールではなく、hERG 抑制作用は QT 延長評価においてポテンシャル評価としては優れているが、真の QT 延長リスク判断には適していないと考えられた。心筋再分極過程には K チャネル以外に Na チャネルや Ca チャネルなども関与しており (Kii *et al.*, 2005)、それらのイオンチャネルを抑制する場合には hERG チャネルを抑制しても心筋再分極時間を延長させない薬剤も存在すると考えられる (Redfern *et al.*, 2003)。また、本研究において、*dl*-sotalol は hERG 阻害力価よりも低い濃度から QT 延長作用を示したことから、hERG 阻害以外の作用機序により QT 延長作用を示した可能性があり、hERG 以外の要因により QT 延長作用を示す薬剤も存在すると考えられる。医薬品の安全性に対する過小評価は患者へのリスクを高める一方、安全性の過大評価は、患者にとって有益な薬剤を開発中止に追い込むことになるため、安全性に対しては適切な評価が必要とされる。QT 延長リスクに関しても同様であり、単一チャネル (hERG チャネル) に対する評価だけでなく、本研究で開発した試験系などを使用して、心筋再分極時間に対して適切に評価することが必要と考えられる。

本研究成果から推奨される創薬早期における QT 延長評価ストラテジーを以下に示す。一次スクリーニングとしてハイスループットスクリーニング (HTS) が可能なオートパッチクランプによる hERG 電流抑制作用に対する *in vitro* 評価を実施した後、有望な化合物について正確性の高い二次スクリーニング評価として麻酔モルモット、麻酔イヌあるいはテレメトリーマーモセットの *in vivo* 心筋再分極試験を実施する。試験系の選択については、対象薬剤の特性、評価する化合物数、供給される化合物量などを考慮して決定する。麻酔モルモットは

多検体処理が可能であり最もスループットに優れているが、小動物であるため多時点で採血できず、薬理作用と血中濃度との相関を得にくいため安全域の算出が難しい。その点、麻酔イヌでは麻酔モルモットと比較して検体処理能力は低い、多時点で血漿中薬物濃度測定用の採血を行うことが可能であり、明確な安全域を求めることができる。一方、テレメトリーマーマセットはあらゆる投与経路での投薬が可能であり、薬剤の溶解性が低く麻酔下の静脈内投与では十分な被験薬の血中濃度が得られない場合には、経口投与などの他の投与経路での実施が必要であるため、有用性が高い。また、多くの薬剤が経口を臨床投与経路として選択しており、薬物動態面（動態プロファイル、代謝物の寄与）を考慮すると臨床投与経路と同じ投与経路での薬剤評価が推奨される。被験薬の特性、各プロジェクトの状況に合わせて、これらの試験系から適切な方法を選択し、心筋再分極評価を実施すべきと考えられる。

著者の所属する中外製薬㈱において、創薬の早期段階から適切な QT 延長評価が行われて創出された新規薬剤である mitemcinal 及び MA-2029 について、QT 延長作用に対する統合的リスク評価を実施した (Kimura *et al.*, 2007a; Kimura *et al.*, 2007b; Tabo *et al.*, 2008a)。Mitemcinal は消化管機能改善薬として期待されていたが、QT 延長リスクのあるエリスロマイシンと類似した化学構造を有し、エリスロマイシンと同程度の hERG 抑制作用を示した (Kimura *et al.*, 2007a)。創薬早期に麻酔モルモット及び麻酔イヌの試験を行い、QT 延長作用を示す濃度を特定して薬効用量との安全域を適切に求め、臨床では QT 延長作用を示さないと判断した (Kimura *et al.*, 2007a; Kimura *et al.*, 2007b)。本薬剤は、臨床における QT 延長試験 (ICH E14, 2005) において QT 延長作用を示さず、創薬早期の統合的リスク評価と一致していた。MA-2029 は過敏性腸症候群治療薬であり、mitemcinal と同様に hERG 抑制作用を有していたが、創薬早期の麻酔イヌ

試験において QT 間隔を短縮させることが明らかとなり、統合的リスク評価では QT 延長リスクの低い薬剤と結論づけた (Tabo *et al.*, 2008a)。これらの薬剤はいずれも hERG 抑制作用を有していたが、創薬早期に適切な *in vivo* 再分極評価を行うことにより、有望な化合物の開発中止を防ぐことに繋がり、創薬早期の正確な QT 延長リスク評価の重要性を支持する知見であった。

本研究において開発した高感度で正確性の高い *in vivo* QT 延長評価系を創薬早期の評価システムに組み込むことにより、医薬品開発の非常に早い研究段階から新規薬剤の正確な統合的 QT リスク評価が可能となり、QT 延長評価のパラダイムシフトに繋がると考えられ、安全性の高い医薬品をより早く創出し、患者・医療現場へすみやかに提供することが可能になると期待される。

V 総括

医薬品開発において心電図 QT 間隔の延長に伴う致死性不整脈の発生が問題となっており、hERG チャンネルの抑制が QT 延長作用の主原因と考えられ、創薬早期段階では *in vitro* における hERG 遮断評価が行われている。しかしながら、hERG チャンネルを抑制しても QT 延長作用を示さない薬剤も多く、hERG 評価だけでは十分なリスク評価とは言えない。本研究では、創薬早期において薬剤誘発性 QT 延長作用を正確に評価することを目的として、麻酔モルモット、麻酔イヌ及び覚醒マーモセットを用いた *in vivo* 評価法を開発した。

1. 心筋再分極時間 (QT 間隔) は心拍数 (あるいは RR 間隔) の変動により生理的に変化するので、薬剤の QT 間隔に対する作用を正確に評価するため、麻酔モルモットと麻酔イヌでは心房にペーシング刺激を行い、心拍数を一定にした条件下で実験を行った。また、麻酔イヌと覚醒マーモセットでは QT 間隔と RR 間隔の関係を求めて最適な QT 補正式を作出することにより、QT 延長作用の検出精度を向上させた。
2. 麻酔モルモットに心房ペーシングを行い、心拍数を一定にした条件下で单相性活動電位 (MAP) を測定した。陽性対照薬 8 種 (E-4031、cisapride、astemizole、terfenadine、bepridil、haloperidol、quinidine、*dl*-sotalol) および陰性対照薬 4 種 (diltiazem、verapamil、chlorpheniramine、captopril) を濃度を変えて静脈内投与した時の MAP 持続時間 (活動電位の振幅が 90% 減衰するまでの時間 : MAP_{90(pacing)}) を調べた結果、陽性対照薬はいずれも濃度依存性に MAP_{90(pacing)} の延長作用を示し、陰性対照薬はいずれも延長作用を示さ

なかった。

本試験において陽性対照薬が $MAP_{90(pacing)}$ を延長した用量 (ED_5 : 5% 延長用量) は、臨床において QT 延長作用を示すと報告された濃度と高い相関性を示した ($R^2=0.7214$)。

3. 麻酔イヌにおいて心房ペーシング刺激が可能な処置を行い、心電図を測定した。心房ペーシングにより、薬剤未処置下において QT 間隔と RR 間隔の関係を求めた結果、RR 間隔が長くなると QT 間隔は延長した。これらの数値を用いて、心拍数の変動の影響を受けない QT 間隔を得るために Bazett、Fridericia、Matsunaga、Van de Water の各補正式及び今回確立した試験別補正式の補正精度を比較検討した。その結果、試験別補正式 ($QTcX=QT/RR^{0.3879}$) が RR 間隔の変動の影響を最も受けにくく、変動係数 (CV) 値も少ない良好な補正能を示した。

この試験別補正式を用いて、陽性対照薬 2 種 (astemizole、*dl*-sotalol) 及び陰性対照薬 1 種 (propranolol) を濃度を変えて静脈内投与し、陽性対照薬の血漿中濃度を測定するとともに、ペーシング刺激を行わない条件下の QTc 間隔 (QTcX 間隔) とペーシング刺激下の QT 間隔 ($QT_{(pacing)}$) に対する作用を調べた。その結果、陽性対照薬は濃度依存性に延長作用を示したが、陰性対照薬は延長作用を示さず、さらに陽性対照薬が QT 延長作用を示した濃度は、報告された臨床試験成績とほぼ一致した。

4. テレメトリー送信器をコモンマーモセットに埋め込み、無麻酔無拘束下で心電図を測定した。マーモセットの QT 間隔と RR 間隔の関係を求めた結果、イヌと同様、RR 間隔が長くなると QT 間隔は延長した。心拍数の変動の影響

響を受けない QT 間隔を得るために Bazett、Fridericia の各補正式及び個別別補正式の補正精度について検討した結果、個別別補正式 ($QT_{ci} = RR_{ref}^{\beta} \times QT / RR^{\beta}$ 、 β : 個別別補正係数) が RR 間隔の変動の影響を最も受けにくく、変動係数 (CV) 値も少ない良好な補正能を示した。

この個別別補正式を用いて、陽性対照薬 2 種 (astemizole、*dl*-sotalol) 及び陰性対照薬 2 種 (propranolol、nifedipine) を経口投与したときの薬剤の作用および血漿中濃度を調べた。陽性対照薬はいずれも QTc 間隔を延長したが、陰性対照薬では QTc 間隔の延長は認められなかった。また、陽性対照薬が QT 延長作用を示した濃度は、報告された臨床試験成績とほぼ同等であった。

5. 本研究において開発した麻酔モルモット、麻酔イヌ及び覚醒マーモセットを用いた評価系は、いずれも感度・特異度ともに非常に優れており、また陽性対照薬の反応性が臨床結果と相関を示したことから検出感度も適切であり、薬剤誘発性 QT 延長評価において有用であることが明らかとなった。麻酔モルモットは多検体処理が可能で最もスループットに優れており、麻酔イヌは多時点で血漿中薬物濃度測定用の採血を行うことができることから明確な被験薬の安全域を求めることが可能である。覚醒マーモセットでは臨床投与経路と同じ投与経路での薬剤評価が可能であり、最も有用性は高いと考えられる。被験薬の特性や評価化合物数に合わせて適切な評価系を選択して、医薬品開発の非常に早い研究段階から新規薬剤の正確な統合的 QT リスク評価を行うことにより、安全性の高い医薬品をより早く医療現場に提供することが可能になると期待される。

謝辞

本論文を発表する機会を与えていただき、その作成に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科 伊藤茂男教授に謹んで御礼申し上げます。また、本論文の作成に際し、御助言を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科 葉原芳昭教授、滝口満喜教授および乙黒兼一准教授に謹んで御礼申し上げます。

中外製薬株式会社において本研究を遂行するにあたり、終始御鞭撻下さり、また、深い御理解を賜りました、研究本部部長 出来俊昭様、安全性研究部長 千葉修一博士、グループマネージャー 木村和哉博士に謹んで御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、御支援を賜りました安全性研究部 原俊子様、元安全性研究部 中村己貴子様、宍戸信之様をはじめ、安全性研究機能の皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 安野尚史, 外山淳治 (1996): Monophasic action potential (MAP) の成因と電気生理学的基礎. 心臓, 28, 249-256.
- Antzelevitch, C., Shimizu, W., Yan, G.X., Sicouri, S., Weissenburger, J., Nesterenko, V.V., Burashnikov, A., Di Diego, J., Saffitz, J. & Thomas, G.P. (1999): The M cell: Its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. J. Cardiovasc. Electrophysiol., 10, 1124-1152.
- Bachmann, A., Mueller, S., Kopp, K., Brueggemann, A., Suessbrich, H., Gerlach, U. & Busch, A.E. (2002): Inhibition of cardiac potassium currents by pentobarbital. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 365, 29-37.
- Baker, B.J., Gammill, J., Massengill, J., Schubert, E., Karin, A. & Doherty, J.E. (1983): Concurrent use of quinidine and disopyramide: Evaluation of serum concentrations and electrocardiographic effects. Am. Heart J., 105, 12-15.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. & Romey, G. (1996): K_v LQT1 and I_sK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. Nature, 384, 78-80.
- Bazett, H.C. (1920): An analysis of the time-relations of electrocardiograms. Heart, 7, 353-370.
- Carlsson, L., Amos, G.J., Andersson, B., Drews, L., Duker, G. & Wadstedt, G. (1997): Electrophysiological characterization of the prokinetic agents cisapride and mosapride *in vivo* and *in vitro*: Implications for proarrhythmic potential? J. Pharmacol. Exp. Ther., 282, 220-227.
- De Clerck, F., Van de Water, A., D'Aubioul, J., Lu, H.R., van Rossem, K., Hermans, A.

- & Van Ammel, K. (2002): *In vivo* measurement of QT prolongation, dispersion and arrhythmogenesis: application to the preclinical cardiovascular safety pharmacology of a new chemical entity. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 16, 125-140.
- De Ponti, F., Poluzzi, E. & Montanaro, N. (2001): Organising evidence on QT prolongation and occurrence of *Torsades de Pointes* with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57, 185-209.
- Desai, M., Tanus-Santos, J.E., Li, L., Gorski, J.C., Arefayene, M., Liu, Y., Desta, Z. & Flockhart, D.A. (2003): Pharmacokinetics and QT interval pharmacodynamics of oral haloperidol in poor and extensive metabolizers of *CYP2D6*. *Pharmacogenomics J.*, 3, 105-113.
- Fridericia, L.S. (1920): Die systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkranken. *Acta. Med. Scand.*, 53, 469-486.
- Funck-Brentano, C. (1993): Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of d-sotalol and d,l-sotalol. *Eur. Heart J.*, 14, 30-35.
- Gintant, G.A., Limberis, J.T., McDermott, J.S., Wegner, C.D. & Cox, B.F. (2001): The canine Purkinje fiber: An *in vitro* model system for acquired long QT syndrome and drug-induced arrhythmogenesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 37, 607-618.
- Guo, L. & Guthrie, H. (2005): Automated electrophysiology in the preclinical evaluation of drugs for potential QT prolongation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 52, 123-135.
- Guth, B.D., Germeyer, S., Kolb, W. & Markert, M. (2004): Developing a strategy for the nonclinical assessment of proarrhythmic risk of pharmaceuticals due to prolonged ventricular repolarization. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 49, 159-169.

- Hamlin, R.L., Nakayama, T., Nakayama, H. & Carnes, C.A. (2003): Effects of changing heart rate on electrophysiological and hemodynamic function in the dog. *Life Sci.*, 72, 1919-1930.
- Hammond, T.G., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Redfern, W.S., Sullivan, A.T. & Camm, A.J. (2001): Methods of collecting and evaluating non-clinical cardiac electrophysiology data in the pharmaceutical industry: results of an international survey. *Cardiovasc. Res.*, 49, 741-750.
- Hanson, L.A., Bass, A.S., Gintant, G., Mittelstadt, S., Rampe, D. & Thomas, K. (2006): ILSI-HESI cardiovascular safety subcommittee initiative: Evaluation of three non-clinical models of QT prolongation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 54, 116-129.
- Harada, T., Abe, J., Shiotani, M., Hamada, Y. & Horii, I. (2005): Effect of autonomic nervous function on QT interval in dogs. *J. Toxicol. Sci.*, 30, 229-237.
- Haverkamp, W., Breithardt, G., Camm, A.J., Janse, M.J., Rosen, M.R., Antzelevitch, C., Escande, D., Franz, M., Malik, M., Moss, A. & Shah, R. (2000): The potential for QT prolongation and proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.*, 21, 1216-1231.
- Hayashi, S., Kii, Y., Tabo, M., Fukuda, H., Itoh, T., Shimosato, T., Amano, H., Saito, M., Morimoto, H., Yamada, K., Kanda, A., Ishitsuka, T., Yamazaki, T., Kiuchi, Y., Taniguchi, S., Mori, T., Shimizu, S., Tsurubuchi, Y., Yasuda, S., Kitani, S., Shimada, C., Kobayashi, K., Komeno, M., Kasai, C., Hombo, T. & Yamamoto, K. (2005): QT PRODACT: A multi-site study of *in vitro* action potential assays on 21 compounds in isolated guinea-pig papillary muscles. *J. Pharmacol. Sci.*, 99,

423-437.

- Hoppu, K., Tikanoja, T., Tapanainen, P., Remes, M., Saarenpaa-Heikkila, O. & Kouvalainen, K. (1991): Accidental astemizole overdose in young children. *Lancet*, 338, 538-540.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, The clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for nonantiarrhythmic drugs (E14). ICH; <http://www.ich.org/>.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals S7B. Recommended for adoption at step 4 of the ICH process on 12 May 2005 by the ICH Steering Committee. ICH; <http://www.ich.org/>.
- Ikeda, S., Oka, H., Matunaga, K., Kubo, S., Asai, S., Miyahara, Y., Osaka, A. & Kohno, S. (1998): Astemizole-induced torsades de pointes in a patient with vasospastic angina. *Jpn. Circ. J.*, 62, 225-227.
- Kakusaka, S., Asayama, M., Kaihara, A., Sasano, T., Suzuki, T., Kurokawa, J. & Furukawa, T. (2009): A receptor-independent effect of estrone sulfate on the hERG channel. *J. Pharmacol. Sci.*, 109, 152-156.
- Katristsis, D., Morgan, J., Brachmann, J., Bygrave, A., O'Farrell, D., Rowland, E. & Camm, A.J. (1997): Electrophysiological effects of E 4031, a drug with selective class III properties, in man. *Pacing Clin. Electrophysiol.*, 20, 930-937.
- Kawakami, K., Nagatomo, T., Abe, H., Kikuchi, K., Takemasa, H., Anson, B.D., Delisle, B.P., January, C.T. & Nakashima, Y. (2006): Comparison of HERG channel blocking effects of various β -blockers –implication for clinical strategy. *Br. J. Pharmacol.*, 147, 642-652.

- Kii, Y., Hayashi, S., Tabo, M., Shimosato, T., Fukuda, H., Itoh, T., Amano, H., Saito, M., Morimoto, H., Yamada, K., Kanda, A., Ishitsuka, T., Yamazaki, T., Kiuchi, Y., Taniguchi, S., Mori, T., Shimizu, S., Tsurubuchi, Y., Yasuda, S., Kitani, S., Shimada, C., Kobayashi, K., Komeno, M., Kasai, C., Hombo, T. & Yamamoto, K. (2005): QT PRODACT: Evaluation of the potential of compounds to cause QT interval prolongation by action potential assays using guinea-pig papillary muscles. *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 449-457.
- Kimura, K., Tabo, M., Itoh, M., Mizoguchi, K., Kato, A., Suzuki, M., Itoh, Z., Omura, S. & Takanashi, H. (2007a): Preclinical electrophysiology assays of mitemincal (GM-611), a novel prokinetic agent derived from erythromycin. *J. Toxicol. Sci.*, 32, 217-230.
- Kimura, K., Tabo, M., Mizoguchi, K., Kato, A., Suzuki, M., Itoh, Z., Omura, S. & Takanashi, H. (2007b): Hemodynamic and electrophysiological effects of mitemincal (GM-611), a novel prokinetic agent derived from erythromycin in a halothane-anesthetized canine model. *J. Toxicol. Sci.*, 32, 231-239.
- Kimura, M., Umemura, K., Ikeda, Y., Kosuge, K., Mizuno, A., Nakanomyo, H., Ohashi, K. & Nakashima, M. (1996): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of (\pm)-sotalol in healthy male volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 42, 583-588.
- Kirsch, G.E., Trepakova, E.S., Brimecombe, J.C., Sidach, S.S., Erickson, H.D., Kochan, M.C., Shyjka, L.M., Lacerda, A.E. & Brown, A.M. (2004): Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: Effects of temperature and stimulus pattern. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 50, 93-101.
- Kurokawa, J., Tamagawa, M., Harada, N., Honda, S., Bai, C.-X., Nakaya, H. & Furukawa, T. (2008): Acute effects of oestrogen on the guinea pig and human I_{Kr}

channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J. Physiol.*, 586, 2961-2973.

Laer, S., Wauer, I. & Scholz, H. (2001): Small blood volumes from children for quantitative sotalol determination using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 753, 421-425.

Mann, K.V., Crowe, S.J.P. & Tietze, K.J. (1989): Nonsedating histamine H₁-receptor antagonists. *Clin. Pharm.*, 8, 331-344.

Manouvrier, J., Sagot, M., Caron, C., Vaskmann, G., Leroy, R., Reade, R. & Ducloux, G. (1986): Nine cases of torsade de pointes with bepridil administration. *Am. Heart J.*, 111, 1005-1007.

Matsunaga, T., Mitsui, T., Harada, T., Inokuma, M., Murano, H. & Shibutani, Y. (1997): QT corrected for heart rate and relation between QT and RR intervals in beagle dogs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 38, 201-209.

Miyazaki, H. & Tagawa, M. (2002): Rate-correction technique for QT interval in long-term telemetry ECG recording in beagle dogs. *Exp. Anim.*, 51, 465-475.

Monahan, B.P., Ferguson, C.L., Killeavy, E.S., Lloyd, B.K., Troy, J. & Cantilena, L.R., Jr. (1990): Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA*, 264, 2788-2790.

Nakamura, H., Kurokawa, J., Bai, C.-X., Asada, K., Xu, J., Oren, R.V., Zhu, Z.I., Clancy, C.E., Isobe, M. & Furukawa, T. (2007): Progesterone regulates cardiac repolarization through a nongenomic pathway: An *in vitro* patch-clamp and computational modeling study. *Circulation*, 116, 2913-2922.

Provan, G., Stanton, A., Sutton, A., Rankin-Burkart, A. & Laycock, S.K. (2005): Development of a surgical approach for telemetering guinea pigs as a model for

- screening QT interval effects. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 52, 223-228.
- Redfern, W.S., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P.K.S., Strang, I., Sullivan, A.T., Wallis, R., Camm, A.J. & Hammond, T.G. (2003): Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc. Res.*, 58, 32-45.
- Rocher, I., Decourt, S., Leneveu, A., Lebrec, D., Rosier, S.P. & Flouvat, B. (1985): Hemodynamic and pharmacokinetic study of propranolol and atenolol in cirrhosis patients. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 23, 406-410.
- Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. & Keating, M.T. (1995): A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: *HERG* encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell*, 81, 299-307.
- Satoh, Y., Sugiyama, A., Tamura, K. & Hashimoto, K. (1999): Effects of a class III antiarrhythmic drug, dofetilide, on the *in situ* canine heart assessed by the simultaneous monitoring of hemodynamic and electrophysiological parameters. *Jpn. J. Pharmacol.*, 81, 79-85.
- Saviuc, P., Danel, V. & Dixmerias, F. (1993): Prolonged QT interval and torsade de pointes following astemizole overdose. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 31, 121-125.
- Schnelle, K. & Garrett, E.R. (1973): Pharmacokinetics of the β -adrenergic blocker sotalol in dogs. *J. Pharm. Sci.*, 62, 362-375.
- Shiotani, M., Harada, T., Abe, J., Hamada, Y. & Horii, I. (2007): Methodological validation of an existing telemetry system for QT evaluation in conscious guinea pigs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 55, 27-34.
- Spence, S., Soper, K., Hoe, C.-M. & Coleman, J. (1998): The heart rate-corrected QT

interval of conscious beagle dogs: A formula based on analysis of covariance.

Toxicol. Sci., 45, 247-258.

Stadnicka, A., Bosnjak, Z.J., Kampine, J.P. & Kwok, W.-M. (2000): Modulation of cardiac inward rectifier K⁺ current by halothane and isoflurane. *Anesth. Analg.*, 90, 824-833.

Sugiyama, A., Aye, N.N., Katahira, S., Saitoh, M., Hagihara, A., Matsubara, Y. & Hashimoto, K. (1997): Effects of nonsedating antihistamine, astemizole, on the *in situ* canine heart assessed by cardiohemodynamic and monophasic action potential monitoring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 89-95.

Sugiyama, A. & Hashimoto, K. (1998): Effects of gastrointestinal prokinetic agents, TKS159 and cisapride, on the *in situ* canine heart assessed by cardiohemodynamic and electrophysiological monitoring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152, 261-269.

Suzuki, A., Bosnjak, Z.J. & Kwok, W.-M. (2003): The effects of isoflurane on the cardiac slowly activating delayed-rectifier potassium channel in guinea pig ventricular myocytes. *Anesth. Analg.*, 96, 1308-1315.

Tabo, M., Kimura, K. & Ito, S. (2007): Monophasic action potential in anaesthetized guinea pigs as a biomarker for prediction of liability for drug-induced delayed ventricular repolarization. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 55, 271-278.

Tabo, M., Komatsu, R., Honda, M., Itoh, M. & Kimura, K. (2008a): Cardiovascular safety profile of MA-2029, a novel motilin receptor antagonist. *J. Toxicol. Sci.*, 33, 631-639.

Tabo, M., Hara, T., Sone, S., Shishido, N., Kuramoto, S., Nakano, K., Onodera, H., Kimura, K. & Kobayashi, K. (2008b): Prediction of drug-induced QT interval

- prolongation in telemetered common marmosets. *J. Toxicol. Sci.*, 33, 315-325.
- Tabo, M., Nakamura, M., Kimura, K. & Ito, S. (2006): QT-RR relationships and suitable QT correction formulas for halothane-anesthetized dogs. *J. Toxicol. Sci.*, 31, 381-390.
- Takasuna, K., Katsuyoshi, C. & Manabe, S. (2009): Pre-clinical QT risk assessment in pharmaceutical companies -Issues of current QT risk assessment-. *Biomol. & Ther.*, 17, 1-11.
- Tamargo, J. (2000): Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn. J. Pharmacol.*, 83, 1-19.
- Tashibu, H., Miyazaki, H., Aoki, K., Akie, Y. & Yamamoto, K. (2005): QT PRODACT: *In vivo* QT assay in anesthetized dog for detecting the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals. *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 473-486.
- Toyoshima, S., Kanno, A., Kitayama, T., Sekiya, K., Nakai, K., Haruna, M., Mino, T., Miyazaki, H., Yano, K. & Yamamoto, K. (2005): QT PRODACT: *In vivo* QT assay in the conscious dog for assessing the potential for QT interval prolongation by human pharmaceuticals. *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 459-471.
- Usui, T., Sugiyama, A., Ishida, Y., Satoh, Y., Sasaki, Y. & Hashimoto, K. (1998): Simultaneous assessment of the hemodynamic, cardiomechanical, and electrophysiological effects of terfenadine on the *in vivo* canine model. *Heart Vessels*, 13, 49-57.
- Van de Water, A., Verheyen, J., Xhonneux, R. & Reneman, R.S. (1989): An improved method to correct the QT interval of the electrocardiogram for changes in heart rate. *J. Pharmacol. Methods*, 22, 207-217.

- van Haarst, A.D., van 't Klooster, G.A.E., van Gerven, J.M.A., Schoemaker, R.C., van Oene, J.C., Burggraaf, J., Coene, M.-C. & Cohen, A.F. (1998): The influence of cisapride and clarithromycin on QT intervals in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 64, 542-546.
- Vorperian, V.R., Zhou, Z., Mohammad, S., Hoon, T.J., Studenik, C. & January, C.T. (1996): Torsade de pointes with an antihistamine metabolite: Potassium channel blockade with desmethylastemizole. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 28, 1556-1561.
- Webster, R., Leishman, D. & Walker, D. (2002): Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de pointes. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 5, 116-126.
- Wymore, R.S., Gintant, G.A., Wymore, R.T., Dixon, J.E., McKinnon, D. & Cohen, I.S. (1997): Tissue and species distribution of mRNA for the I_{Kr} -like K^+ channel, *erg*. *Circ. Res.*, 80, 261-268.
- Yamamoto, K., Tamura, T., Imai, R. and Yamamoto, M. (2001): Acute canine model for drug-induced Torsades de Pointes in drug safety evaluation-Influences of anesthesia and validation with quinidine and astemizole. *Toxicol. Sci.*, 60, 165-176.
- Zhang, S., Zhou, Z., Gong, Q., Makielski, J.C. & January, C.T. (1999): Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ. Res.*, 84, 989-998.
- Zhou, Z., Vorperian, V.R., Gong, Q., Zhang, S. & January, C.T. (1999): Block of HERG potassium channels by the antihistamine astemizole and its metabolites desmethylastemizole and norastemizole. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 10, 836-843.

Zylber-Katz, E., Turetz-Abramovitch, M., Koren, G. & Levy, M. (1988):
Pharmacokinetic interaction between nifedipine and propranolol. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2, 29-35.

Studies of *in vivo* drug-induced QT interval prolongation
in early-stage drug development

Mitsuyasu Tabo

The potential for non-cardiac drugs to induce QT interval prolongation accompanied by a rare but life-threatening lethal arrhythmia has generated intense interest and concern in the development of pharmaceuticals. Because inhibition of the hERG channel is considered the main cause for the QT interval prolongation, *in vitro* hERG inhibitory tests are generally conducted in early-stage drug development. However, hERG inhibitors do not necessarily cause QT prolongation and hERG tests are considered insufficient for actual QT risk assessment. In this study, in consideration of accurate QT risk evaluation in the early stages, I developed *in vivo* assays using anesthetized guinea pigs, anesthetized dogs and conscious common marmosets.

1. Since the period of ventricular repolarization (QT interval) adapts to changes in the heart rate (or RR interval), studies using anesthetized guinea pigs and dogs were conducted under a fixed heart rate using atrial pacing to accurately assess the effects of drugs on the QT interval. In addition, studies using anesthetized dogs and conscious marmosets were performed under highly sensitive conditions using the appropriate QT correction formula obtained from a relationship between QT and RR intervals.
2. The monophasic action potential (MAP) was measured in anesthetized guinea pigs under a fixed heart rate using atrial pacing. Eight positive reference drugs

(E-4031, cisapride, astemizole, terfenadine, bepridil, haloperidol, quinidine, *dl*-sotalol) and four negative reference drugs (diltiazem, verapamil, chlorpheniramine, captopril) were intravenously administered at various dosages to assess the effects on the MAP duration (MAP_{90(pacing)}: action potential duration at 90% repolarization level). All positive reference drugs showed dose-dependent MAP_{90(pacing)} prolongation, whereas the negative reference drugs did not.

There was a clear correlation between each estimated 5% MAP_{90(pacing)} prolonging dose (ED₅: 5% effective dose) of the eight positive reference drugs and the clinical plasma concentration associated with QT prolongation previously reported ($R^2=0.7214$).

3. The electrocardiogram (ECG) under atrial pacing conditions was measured in anesthetized dogs. A relationship between the QT and RR intervals under a nontreatment condition was clarified. The QT/RR relationship indicated that when the RR interval was prolonged, prolongation of the QT interval followed. In order to obtain a QT interval uninfluenced by changes in the heart rate, QT corrections were compared among the formulae of Bazett, Fridericia, Matsunaga, Van de Water and the study original. The study original formula ($QTcX=QT/RR^{0.3879}$) eliminated the influence of RR interval most effectively and resulted in small CV values, indicating that the method showed the most appropriate correction of the QT interval against the RR interval.

Two positive reference drugs (astemizole, *dl*-sotalol) and one negative reference drug (propranolol) were intravenously administered to assess the effects on the QTc interval corrected by the study original QT correction formula at sinus rhythm

(QTcX) and QT interval under atrial pacing ($QT_{(pacing)}$) and the plasma drug concentrations were measured. All of the positive reference drugs dose-dependently prolonged the QTcX interval and $QT_{(pacing)}$, whereas the negative reference drugs failed to do so. The plasma concentrations of the positive reference drugs associated with QT prolongation were mostly consistent with those associated with previously reported clinical QT prolongation.

4. Common marmosets were implanted with telemetry transmitters. ECG was measured under a conscious condition and a relationship between QT and RR intervals was clarified. The QT/RR relationship indicated that when RR interval was prolonged, prolongation of the QT interval followed, as with the abovementioned anesthetized dogs. In order to obtain a QT interval uninfluenced by changes in heart rate, the QT correcting formulae of Bazett, Fridericia and individual correction were compared. The individual QT correction method ($QT_{ci} = RR_{ref}^{\beta} \times QT / RR^{\beta}$, where β is the individual correction coefficient) most effectively eliminated the influence of RR interval and resulted in small CV values, indicating that the method showed the most appropriate correction of the QT interval against the RR interval.

Two positive reference drugs (astemizole, *dl*-sotalol) and two negative reference drugs (propranolol, nifedipine) were orally administered to assess the effects on the QTc interval corrected by the individual QT correction formula and the plasma drug concentrations measured. All positive reference drugs showed QTc interval prolongation, whereas the negative reference drugs did not. The plasma concentrations of the positive reference drugs associated with QT prolongation

were mostly consistent with those associated with previously reported clinical QT prolongation.

5. All of the assays using anesthetized guinea pigs, anesthetized dogs and conscious marmosets developed in this study showed high sensitivity and high specificity. In addition, the quality of sensitivity was appropriate because the results of the positive reference compounds showed a clear correlation with clinical outcomes. Therefore, these assays would be useful for the assessment of drug-induced QT interval prolongation. The anesthetized guinea pig assay can deal with many different test compounds and is superior in throughput. The anesthetized dog assay can accurately clarify the safety margin of test compounds because of the many blood-sampling points for the measurement of plasma drug concentration. The conscious marmoset assay can be conducted with the same drug administration route used in clinic and thus could be effectively utilized. The appropriate assay should be selected according to the characteristics and the number of test compounds. Incorporation of these assays into early-stage drug development would provide a potentially accurate and more integrated assessment of QT risk and thus a more timely introduction of new pharmaceuticals into the clinic stages with fewer safety issues.